



Réf :...../UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2021

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par :

M^{lle} KERKAR Hayet & M^{lle} ZAMOUM Djahida

Thème

Étude de l'effet protecteur des antioxydants à l'égard de l'oxydation induite par les anticancéreux sur la cellule spermatique

Soutenu le : 12/07/2021

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>M. ARAB Amar</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>M. BOURNINE Lamine</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>M^{me} BENSMAIL Souhila</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examinatrice</i>

Année universitaire : 2020/2021

Remerciements

Nous remercions Dieu le tout puissant, qui nous a, par sa bénédiction, accordé le courage, la force et la patience pour mener à terme ce travail.

*Nous tenons tout d'abord, à adresser notre grande gratitude et nos remerciements les plus sincères à notre promoteur **M. BOURNINE**, qui nous a encadré et accordé toute sa confiance durant l'accomplissement de cette thématique. Nous avons beaucoup apprécié de travailler avec ce promoteur et nous avons énormément appris en suivant ses conseils. **M. BOURNINE** a été pour nous un encadreur exceptionnel. Nous vous devons tout notre respect et toute notre reconnaissance et notre profond attachement.*

*Toutes nos expressions de respect à **M. ARAB** qui nous a honorés de sa présence en sa qualité de président du jury.*

*Nos sincères remerciements et considérations sont exprimés à **M^{me} BENSMAIL** qui a accepté d'examiner ce travail et d'avoir consacré tout son temps pour l'évaluer.*

*Nous adressons aussi nos remerciements à **M^{me} BOURNINE**, pour toute sa disponibilité, son aide et sa gentillesse. Nous vous assurons de nos profondes reconnaissances et respects.*

*Nous remercions tout particulièrement le **Pr. IGUER-OUADA** qui nous a honorées d'accepter le déroulement de stage au sien de son laboratoire.*

*Nous exprimons aussi notre gratitude à l'ensemble du personnel du laboratoire « Associé en Écosystèmes Marins et Aquacoles » de l'université de Bejaia plus particulièrement **M^{lle} CHEMLAL** et **M. BENBARKANE** qui nous ont bien aidé et orienté.*

*Nous tenons à exprimer nos chaleureux remerciements **à tous nos enseignants**, qui nous ont accompagnés tout le long de notre cursus universitaire.*

Enfin, nous remercions tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin pour la réalisation de ce mémoire de fin d'études.

Merci

Dédicaces

J'ai le grand honneur de dédier le fruit de mes années d'études avec un grand amour à toutes les personnes qui me sont chères.

A Mon cher père, qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger, que Dieu vous garde très longtemps pour nous et en meilleure santé.

A la mémoire de ma mère et ma grand-mère que j'aurais aimé avoir à mes côtés tous les jours, paix à votre âmes, que Dieu vous accueille dans son vaste paradis.

A ma belle-mère pour son assistance et sa présence dans ma vie autant qu'une maman, un immense merci pour votre sacrifice.

A mon grand-père, qui n'a jamais cessé de m'encourager, je tiens beaucoup à vous.

A mes chères frères et sœurs : Asma, Ibtissem, Samir et Abderrahim, votre existence éclaire ma vie.

A ma chère tante (Nana Salima), qui m'a toujours donné les meilleurs de ses conseils que Dieu te garde en bonne santé, je t'aime énormément.

*A toute ma famille : mes tantes, mes oncles, mes cousins et cousines
En particulier 'Khalti Safia' et 'Mon SponjBob'*

A mon binôme Hayet : sans toi ce travail n'aurait pas été possible.

A mes chères amies Yasmine, Dihia, Sarah, Fariza et Hanane pour votre amitié sincère et fidèle, que sans elle la vie n'aurait pas la même saveur.

A tous ceux et celles que j'ai côtoyé depuis mon enfance

Sans vous tous je n'aurais jamais atteint ce stade

Djahida

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Ma famille avec ma profonde gratitude et grand amour,

Mes très chers parents, à qui j'exprime ma sincère reconnaissance pour leur soutien moral et leurs encouragements tout au long de mes études même dans les moments difficiles, que Dieu les protège, je leur serai éternellement reconnaissante.

*Mes très chers frères **Djamel** et **Madjid**.*

*Mes très chères sœurs **Fayrouz**, **Fazia**, **Nadjet**, **Karima** et **Khadidja** et leurs époux et leurs enfants **Amayas**, **Amira**, **Yanni**.*

***A mon binôme Djahida:** sans toi ce travail n'aurait pas été possible.*

*Sans oublier mes très chers amis et tous les camarades de la section Master II
Biochimie Appliquée.*

Et à tous ceux que je n'ai pas cités

Hayet

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

Synthèse Bibliographique

I. La chimiothérapie anticancéreuse..... 3

I.1. Généralités sur la chimiothérapie anticancéreuse..... 3

I.2. Les différents types des agents anticancéreux 3

I.2.1. Les agents alkylants 3

I.2.2. Les anti-métabolites 3

I.2.3. Les poisons du fuseau 4

I.3. Les effets indésirables de la chimiothérapie anticancéreuse 7

I.3.1. Les effets cardiovasculaires 7

I.3.2. Le dysfonctionnement rénal 7

I.3.3. L'anémie chimio-induite 7

I.3.4. La thrombopénie 8

I.3.5. La stérilité..... 8

II. La stérilité masculine chimio-induite..... 10

II.1. Rappel sur la spermatogénèse 10

II.1.1. L'anatomie des testicules 10

II.1.2. Le liquide séminal 10

II.1.3. Les spermatozoïdes 11

II.1.4. Les différentes fractions du sperme 13

II.1.5. La spermatogénèse 13

II.2. La stérilité masculine..... 15

II.2.1. Définition de la stérilité..... 15

II.2.2. Classification de la stérilité 15

II.2.3. Le bilan de l'infertilité masculine	17
II.3. Aspect de perturbation des fonctions génitales et gonadiques par les anticancéreux.....	19
II.3.1. Les effets sur les caractéristiques testiculaires	19
II.3.2. Les troubles hormonaux	20
II.3.3. Les effets sur la morphologie et les caractéristiques des spermatozoïdes.....	20
II.3.4. Les effets sur la spermatogénèse	20
III. Le statut oxydatif dans le tractus génital masculin.....	23
III.1. Le stress oxydant.....	23
III.1.1. Les sources du stress oxydant	23
III.1.2. Les effets du stress oxydant sur les composants cellulaires.....	24
III.1.3. Les méthodes de mesure du stress oxydant dans le sperme.....	26
III.2. La protection par les antioxydants.....	27
III.2.1. La définition des antioxydants	27
III.2.2. Les types des antioxydants	27
III.2.3. Le mode de protection par les antioxydants.....	29
 <i>Partie pratique</i> 	
I. Matériel et méthodes.....	31
I.1. Matériel.....	31
I.1.1. Matériel biologique	31
I.1.2. Produits chimiques et appareillage.....	31
I.1.3. Système CASA.....	32
I.2. Méthodes.....	33
I.2.1. Préparation de la solution TRIS	33
I.2.2. Collecte du sperme épидидymaire.....	33
I.2.3. Préparation des solutions d'anticancéreux et d'antioxydants.....	34
I.2.4. Étude de l'impact direct des anticancéreux sur les spermatozoïdes.....	35
I.2.5. Étude de l'effet protecteur des antioxydants à l'égard de l'effet délétère des anticancéreux sur les spermatozoïdes	37
I.2.6. Analyse statistique.....	38
II. Résultats	39
II.1. Effets des anticancéreux sur la motilité de spermatozoïdes	39

II.2. Effet protecteur des antioxydants contre l'effet délétère de CBCDA sur les spermatozoïdes	41
II.3. Effet protecteur des antioxydants à l'égard des dommages induits par le TXL sur les spermatozoïdes	42
III. Discussion	43
Conclusion	46
Références bibliographiques.....	47

Liste des abréviations

3B-HSD	3B-hydroxstéroïde déshydrogénase
4-HNE	4-hydroxynonéal
5-FU	5-fluorouracile
8-OH-dG	Hydroxyguanine
AC	Anticancéreux
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGPI	Acides gras polyinsaturés
ARN	Acide ribonucléique
CASA	Analyseur de sperme assisté par ordinateur
CAT	Catalase
CBCDA	Carboplatine
CDDP	Cisplatine
CYP	Cyclophosphamide
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FSH	Hormone folliculo-stimulante
G6PD	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GB	Globule blanc
Gn-RH	Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires
GPX	Glutathions peroxydases
GR	Globule rouge
GSH	Glutathion réduit
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
ICSI	Injection intracytoplasmique de spermatozoïdes
LH	Hormone lutéinisante
MDA	Malondialdéhyde
MT	Métallothionéines
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBT	Nitrobluetetrazolium
OMS	Organisation mondiale de la santé
PNN	Polynucléaires neutrophiles

RDI	Intensité de dose relative
SO	Stress oxydant
SOD	Superoxyde dismutase
SPZ	Spermatozoïdes
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling</i>
TXL	Paclitaxel
VAP	Vitesse moyenne de trajet
VCL	Vitesse curviligne
VIT C	Vitamine C
VIT E	Vitamine E
VSL	Vitesse en ligne droite

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie d'un testicule humain.....	10
Figure 2: L'anatomie du spermatozoïde humain	12
Figure 3: Les étapes de la spermatogenèse chez l'homme	14
Figure 4: La transformation d'une spermatide en spermatozoïde pendant la phase de la spermiogénèse	15
Figure 5: Les différentes sources du stress oxydatif	23
Figure 6: Le mécanisme de la peroxydation lipidique	25
Figure 7: Génération des dérivés actifs de l'oxygène	26
Figure 8: Photo de l'analyseur CASA.....	32
Figure 9: La méthode de la collecte de la semence à partir du testicule du Bélier.	34
Figure 10: Le protocole d'étude de l'impact direct des anticancéreux sur les spermatozoïdes du Bélier	36
Figure 11: Le protocole d'étude de l'effet protecteur des antioxydants contre les dommages engendrés par les anticancéreux sur les spermatozoïdes du Bélier..	38
Figure 12: Diagramme expliquant certains paramètres cinétiques du sperme.....	39
Figure 13: Les paramètres de mobilité spermatique après incubation des spermatozoïdes avec les anticancéreux TXL et CBCDA.....	40
Figure 14: Les paramètres de mobilité des spermatozoïdes après incubation avec le CBCDA prétraités par les antioxydants	41
Figure 15: Les paramètres de mobilité des spermatozoïdes après incubation avec le TXL prétraités par les antioxydants	42

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification des agents de chimiothérapie couramment utilisés dans les protocoles du traitement des cancers.....	5
Tableau 2: Traitements anticancéreux classés en fonction de leur impact sur la fonction ovarienne	9
Tableau 3 : Exemples de différents agents cytotoxiques et leur degré de gonadotoxicité.....	22
Tableau 4 : Les produits et le matériel utilisés dans les expérimentations.	31

Introduction

Introduction

La chimiothérapie est un pilier des protocoles anticancéreux, contribuant de manière significative à l'amélioration de l'espérance de vie des personnes atteintes de cancers. La thérapie anticancéreuse conventionnelle cible non seulement les cellules malignes mais également les cellules saines, ce qui entraîne des effets secondaires, notamment la survenue de problèmes d'infertilité (**Allen et al. 2018**).

L'infertilité est un problème de santé majeur impliquant environ 15% des couples, dont la moitié des cas concerne le genre masculin (**Barati et al. 2020**). Les effets des traitements anticancéreux sur la fertilité masculine ont déjà été décrits dans la littérature. En effet, plusieurs travaux de recherche s'intéressent à l'étude de l'effet des médicaments anticancéreux sur les cellules souches, l'une des cibles les plus connues de la chimiothérapie anticancéreuse. L'effet de ces agents est gonadotoxiques, qui dépend de la classe du médicament administré, des éventuelles associations de substances, de la dose ainsi que de la durée du traitement (**Yamaguchi and Fujisawa 2011**). L'utilisation d'agents antinéoplasiques, seuls ou en association, entraîne une perturbation de la spermatogénèse (**Ghobadi et al. 2017**).

En outre, d'autres effets indésirables ont été associés à un stress oxydant (SO) par la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans les testicules (**Shati 2019**). Notamment, une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes à savoir, la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) ainsi qu'un taux faible en glutathion (GSH) ont été signalés (**Shati 2019; Nna et al. 2020**).

Par ailleurs, pour prévenir la gonadotoxicité des agents anticancéreux, des antioxydants ont été utilisés comme un traitement adjuvant afin de réduire les dommages causés par le SO (**Rabaça et al. 2020**). Néanmoins, l'impact des anticancéreux sur les spermatozoïdes matures *in vitro* est peu et/ou mal étudié. En effet, seulement deux études ont été réalisées, la première à démontrer l'effet de certains anticancéreux sur la mobilité spermatique (**Hong et al. 1985**) et la deuxième à démontrer l'effet protecteur de la N-acétylcystéine (NAC) sur les dommages engendrés par l'étoposide sur les spermatozoïdes (**Rabaça et al. 2020**).

A partir de ces études antérieures converge l'objectif de ce présent travail, qui consiste à entreprendre deux démarches complémentaires. La première étant l'étude de l'impact direct des anticancéreux sur les spermatozoïdes matures et la deuxième démarche concerne

l'évaluation de l'effet protecteur des antioxydants à savoir la vitamine E et la vitamine C, seules ou en association à l'égard des dommages engendrés par des agents anticancéreux sur ces cellules. Il est admis que la mobilité de la cellule spermatique est révélatrice de son état physiologique et des impacts négatifs qu'elle subit. Pour cela, nous avons opté pour la mesure des paramètres de la mobilité spermatique, à savoir la vitesse en ligne droite (VSL), la vitesse curviligne (VCL), la vitesse moyenne du trajet (VAP) ainsi que le pourcentage des progressifs rapides (% PR).

Synthèse Bibliographique

I. La chimiothérapie anticancéreuse

I.1. Généralités sur la chimiothérapie anticancéreuse

La chimiothérapie anticancéreuse fournit des traitements à efficacité variable pour la plupart des cancers humains qui sert de traitements curatifs pour certains types de cancers. Le rôle de la chimiothérapie sera beaucoup plus élargi et jouera son rôle dans l'amélioration à la fois de l'espérance de vie des patients atteints de cancers (**Allen et al. 2018**).

I.2. Les différents types des agents anticancéreux

I.2.1. Les agents alkylants

Sont les médicaments les plus étudiés chez l'homme (**Chevreau and Huguet 1995**). Ils intercalent dans l'ADN en se liant au bases guanine ou cytosine, et remplacent les protons soit par des groupes alkylants (-CH₃) ou par des atomes de platine (-Pt) et ils créent ainsi des lésions au niveau de l'ADN. L'accumulation de lésions entraîne une perturbation de la réplication et systématiquement la mort cellulaire. Ce sont les médicaments les plus toxiques pour l'épithélium germinale, leur effet dépend de la dose (**Allen et al. 2018**). Cette classe comporte :

- Les moutardes à l'azote, comme le cyclophosphamide, l'ifosfamide et le melphalan ;
- Les organoplatines comme le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine ;
- Le busulfan, le témozolomide, le thiotepa, la carmustine,...

I.2.2. Les anti-métabolites

Sont des molécules qui possèdent des structures analogues aux substances biologiques impliqués dans les fonctions cellulaires. Elles interrompent la synthèse des acides nucléiques (ADN/ARN), soit en s'incorporant frauduleusement dans l'ADN ou dans l'ARN ou en inhibant de manière spécifique des enzymes critiques de la synthèse des acides nucléiques (**Allen et al. 2018**). Cette classe est composé de:

- Les analogues de la pyrimidine : 5-fluorouracile, gemcitabine, cytarabine, capécitabine...
- Les analogues de la purine : 6-mercaptopurine, fludarabine, clofarabine, cladribine...
- Les analogues de l'acide folique : méthotrexate et pémétréxed...
- Les autres inhibiteurs d'enzymes : asparaginase et hydroxycarbamide...

- Les inhibiteurs des topoisomérases: les inhibiteurs des topoisomérases I (irinotécan, topotécan) et II (étoposide), sont des enzymes qui coupent l'un (pour IT I) ou les deux brins d'ADN (pour IT II) et stabilisent le complexe topoisomérase-ADN, et ainsi inhibent la relégation. Ils interfèrent avec la tubuline et dans l'élaboration de la molécule de l'ADN (**Allen et al. 2018**).

I.2.3. Les poisons du fuseau

Constituent un groupe de médicaments anticancéreux d'origine naturelle, caractérisés par leur cible. Le fuseau achromatique permet aux chromosomes de migrer lors de la mitose (**Robert 2007**). Ces médicaments inhibent le désassemblage des microtubules (**Allen et al. 2018**). Cette classe comporte :

- Les vinca alcaloïdes (vinblastine, vincristine, vindésine et vinorelbine) inhibent la polymérisation de la tubuline en microtubules (**Robert 2007**).

- Les taxanes (paclitaxel et docétaxel) inhibent la dépolymérisation des microtubules (**Robert 2007**).

Tableau 1: Classification des agents de chimiothérapie couramment utilisés dans les protocoles du traitement des cancers (**Allen *et al.* 2018**).

Classe des médicaments de chimiothérapie	Cancers traités	Exemples des molécules thérapeutiques
Agents alkylants	Cancer des os	Carboplatine
	Tumeurs du SNC	Chlorambucil
	Lymphome de Hodgkin	Cisplatine
	Cancer du rein	Cyclophosphamide
	Leucémie	Ifosfamide
	Neuroblastome	Méchloréthamine
	Lymphome non hodgkinien	Melphalan
	Sarcome des tissus mous	Oxaliplatine
Anthracyclines	Cancer des os	Daunorubicine
	Lymphome de Hodgkin	Doxorubicine
	Cancer du rein	
	Leucémie	
	Neuroblastome	
	Lymphome non hodgkinien	
	Sarcome des tissus mous	
Antimétabolites	Cancer des os	Cytarabine
	Leucémie	Fluoro-uracile

A suivre

Suite tableau 1

Classe des médicaments de chimiothérapie	Cancers traités	Exemples des molécules thérapeutiques
	Lymphome non hodgkinien	Mercaptopurine Méthotrexate Thioguanine
Non anthracycline	Cancer des os	Bléomycine
Antibiotiques	Lymphome de Hodgkin	Dactinomycine
	Sarcome des tissus mous	Mitomycine
Taxanes	Sarcome d'Ewing	Docétaxel Paclitaxel
Inhibiteurs de la topoisomérase	Cancer des os	Etoposide
	Leucémie	Irinotécan
	Sarcome des tissus mous	Téniposide
Vinca alcaloïdes	Cancer des os	Vinblastine
	Tumeur du SNC	Vincristine
	Lymphome de Hodgkin	
	Cancer du rein	
	Leucémie	
	Neuroblastome	
	Lymphome non hodgkinien	
	Sarcome des tissus mous	

I.3. Les effets indésirables de la chimiothérapie anticancéreuse

Les médicaments de chimiothérapie ciblent non seulement les cellules cancéreuses, mais également les cellules saines. Chaque médicament de chimiothérapie a une toxicité particulière. C'est la raison pour laquelle une chimiothérapie entraîne parfois des effets secondaires tels que les nausées, les vomissements, la diarrhée, la constipation, les aphtes, la sécheresse de la bouche, la chute des cheveux, toxicités hématologiques (une diminution simultanée des GB, GR et des plaquettes) ainsi que la fatigue et les douleurs (**Young 2016**).

Parfois, la chimiothérapie altère significativement certains organes et provoque leur dysfonctionnement :

I.3.1. Les effets cardiovasculaires

Les thérapies anticancéreuses modernes peuvent être associées à des effets secondaires cardiovasculaires importants. Elles peuvent entraîner une ischémie cardiovasculaire, des arythmies, un dysfonctionnement cardiaque, une insuffisance cardiaque et une hypertension artérielle. Les médicaments anticancéreux, ou plus spécifiquement le trastuzumab, peuvent induire un dysfonctionnement cardiaque et une insuffisance cardiaque (**Storstecky and Suter 2010**).

I.3.2. Le dysfonctionnement rénal

L'insuffisance rénale chronique est un phénomène courant chez les patients atteints d'un cancer gynécologique. Le traitement anticancéreux systémique chez ces patients est un défi pour les cliniciens en raison de la modification de la pharmacocinétique des médicaments. Pour les médicaments qui sont principalement éliminés par les reins, une fonction rénale insuffisante qui peut entraîner une toxicité importante. Une adaptation posologique basée sur les changements pharmacocinétiques est nécessaire dans cette situation pour éviter une toxicité potentiellement mortelle (**Li et al. 2007**).

I.3.3. L'anémie chimio-induite

L'anémie est une complication fréquente de la chimiothérapie myélosuppressive qui entraîne une diminution de la capacité fonctionnelle et de la qualité de vie des patients cancéreux, particulièrement en cancérologie pulmonaire. L'incidence de l'anémie augmente avec le nombre de cycles de chimiothérapie. L'anémie sévère est traitée avec des transfusions de globules rouges. (**Groopman and Itri 1999**).

I.3.4. La thrombopénie

La thrombopénie induite par la chimiothérapie est une complication fréquente du traitement anticancéreux, entraînant un risque important de saignement, lorsque la thrombopénie est sévère (<10 000/ml). Par conséquent, elle conduit à une réduction de l'intensité de dose relative (RDI) du traitement anticancéreux (**Mones and Soff 2019**).

I.3.5. La stérilité

I.3.5.1. La stérilité masculine

Certains médicaments de chimiothérapie diminuent le nombre de spermatozoïdes et entraînent donc un risque d'une diminution de la fertilité d'où une stérilité masculine. Cela, varie selon le type du traitement, des doses administrées, de l'âge, de l'état de santé général du patient et le mode d'action. Au niveau des spermatozoïdes cette action délétère peut provoquer l'altération de l'ADN avec notamment la fragmentation de l'ADN, une anomalie numérique ou structurale des chromosomes, des dysfonctionnements du processus méiotique et une mort cellulaire par nécrose ou par apoptose. La fertilité peut être restituée selon les anticancéreux utilisés (**Bujan and De Mas 2002**).

I.3.5.2. La stérilité féminine

Une chimiothérapie puissante peut entraîner une insuffisance ovarienne prématurée et une perte de fertilité chez les femmes et les enfants (Tableau 2). La cryoconservation des embryons est une procédure clinique établie de préservation de la fertilité mais avec plusieurs restrictions. Cependant, en cas du traitement gonadotoxique élevé, la cryoconservation du tissu du cortex ovarien doit être proposée (**Gauthier et al. 2010**). Autrement dit, certains médicaments de chimiothérapie perturbent le cycle menstruel des femmes : cycles irréguliers, quantité modifiée ou interruption totale des règles. Si c'est le cas, la patiente ressent les symptômes associés à la ménopause : bouffées de chaleur, sécheresse de la peau et des muqueuses, sécheresse vaginale ainsi que des démangeaisons de la vulve. Afin de diminuer ces effets secondaires, un traitement hormonal substitutif de la ménopause peut être proposé, sauf en cas de cancers hormono-dépendants.

Tableau 2: Traitements anticancéreux classés en fonction de leur impact sur la fonction ovarienne (Poirot *et al.* 2013).

Haut risque	Risque moyen	Risque faible ou sans risque
Cyclophosphamide	Cisplatine	Méthotrexate
Chorambucil	Adriamycine	5-fluorouracile
Melphalan		Vincristine
Busulfan		Bléomycine
Moutarde azotée		Actinomycine D
Procarbazine		

II. La stérilité masculine chimio-induite

II.1. Rappel sur la spermatogénèse

II.1.1. L'anatomie des testicules

Les testicules sont des organes pairs, assurant une fonction exocrine par la production des spermatozoïdes et une fonction endocrine par la sécrétion des hormones. Le testicule est entouré d'une enveloppe résistante « l'albuginée » qui transmet des cloisons à l'intérieur de celui-ci, le segmentant en lobules contenant les tubes séminifères (Figure 1). Le testicule est composé de l'épididyme qui s'étend tout au long de son bord dorso-cranial. Il est relié via des canaux efférents et se prolonge par le canal déférent qui se connecte à l'urètre en passant par les vésicules séminales (Robaire *et al.* 2006).

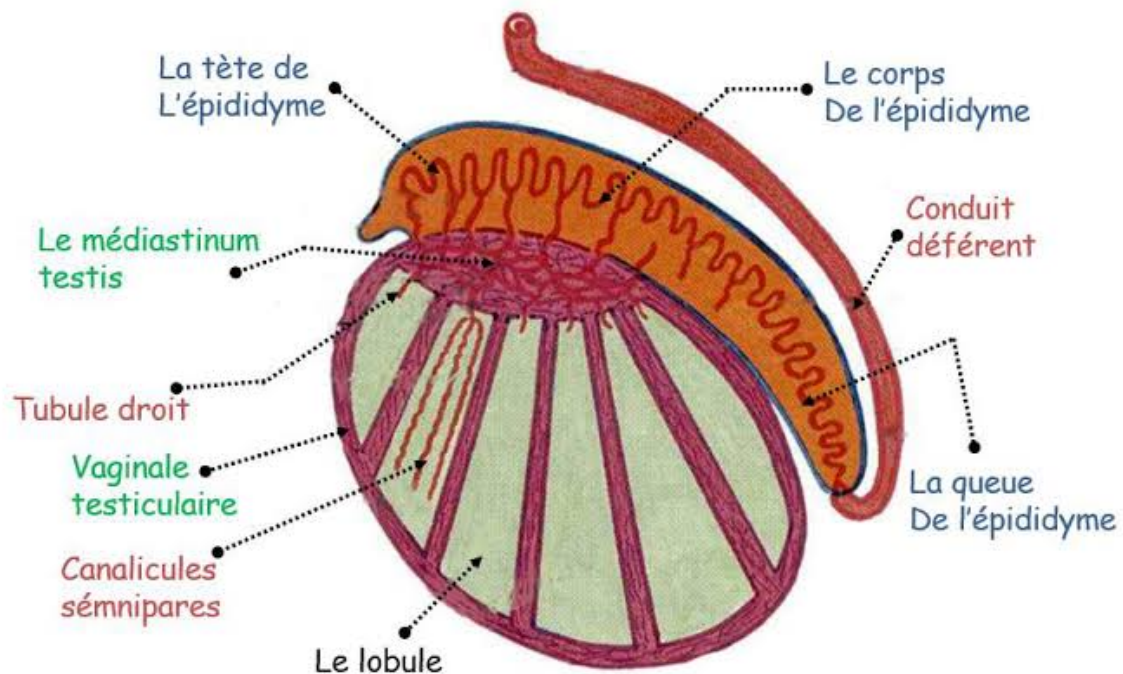


Figure 1 : Anatomie d'un testicule humain (Robaire *et al.* 2006).

II.1.2. Le liquide séminal

Le liquide séminal est une fraction liquidienne du sperme, il est constitué de spermatozoïdes en suspension qui est contenu dans les sécrétions d'origine testiculaire et épидидymaire. Au moment de l'éjaculation, ces dernières se fusionnent avec les sécrétions de

la prostate, des vésicules séminales et des glandes bulbo urétrales (glandes de Cowper). Le mélange de ces différentes sécrétions est constitué par **(Rollet 1999)** :

- 10 ~ 20 % de sécrétion épидидymaire ;
- 20 ~ 40 % de sécrétion prostatique ;
- 40 ~ 60 % de sécrétion vésiculaire ;
- Environ 5 % de sécrétion des glandes de Cowper.

II.1.3. Les spermatozoïdes

Un spermatozoïde est un gamète mâle de petite taille d'environ 55 μm , léger et mobile qui a une durée de vie de 2 jours et qui intervient dans la reproduction sexuée. Il y a environ 80 à 100 millions de spermatozoïdes dans l'éjaculat. Lors de la fécondation, le spermatozoïde s'unit à un ovule (gamète femelle) pour former une cellule-œuf, qui se développera ensuite en embryon pour donner un nouvel individu de la même espèce **(Rives et al. 2012)**.

II.1.3.1. L'anatomie du spermatozoïde

a. La tête : contient un noyau haploïde, de 3 à 5 μm de longueur. elle apparaît verticalement ovulaire et de profile elle a la forme d'une poire ; dont sa partie effilée porte l'acrosome sous forme d'un capuchon.

b. Le col : est à l'origine du flagelle, de taille courte ; réalise la jonction entre la tête et la pièce intermédiaire. Il présente une articulation autour de laquelle les parties adjacentes sont mobiles.

c. La pièce intermédiaire: d'une longueur d'environ 6 μm , elle est relativement épaisse et contient le filament axial autour duquel s'enroule un filament spiral. Elle contient aussi des mitochondries et un cytoplasme (Figure 2).

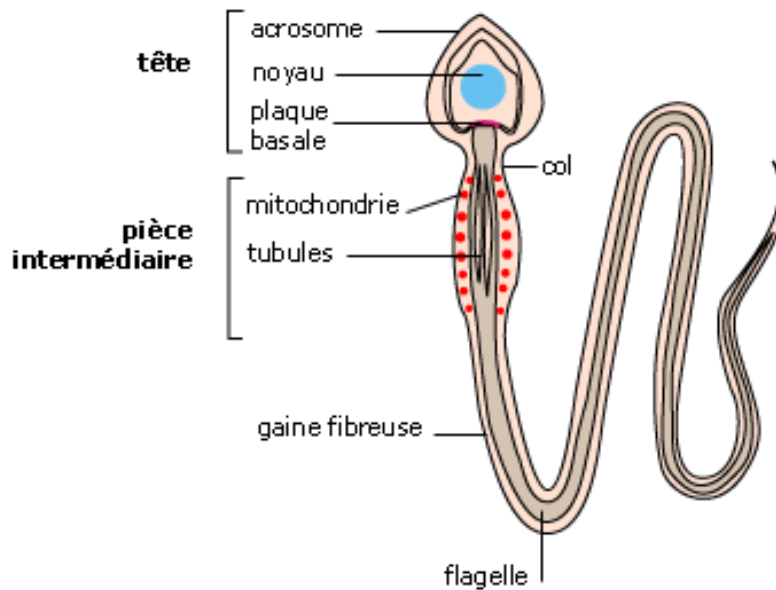


Figure 2: L'anatomie du spermatozoïde humain (**Rives *et al.* 2012**).

II.1.3.2. La composition membranaire du spermatozoïde

Tous les spermatozoïdes de mammifères sont entourés d'une membrane plasmique qui est formé par de nombreux événements précoces pendant la fécondation. Il se caractérise par une proportion inhabituellement élevée de phospholipides polyinsaturés qui lui confèrent des caractéristiques physiques spéciales. La membrane des spermatozoïdes contient trois grands groupes de lipides :

- Les lipides complexes : composés d'au moins trois éléments de nature différente. Ils comprennent les phosphoglycérides (phospholipides et plasmalogènes) et les glycolipides (glycérides complexes, sphingolipides et lipopolysaccharides).

- Les lipides simples ou neutres : ils contiennent un ou deux composants et sont généralement neutres. Ils englobent principalement les acylglycérols ou glycérides (mono-, di- et triglycérides), les acides gras (AG) et les stérols. Ces derniers pouvant être libres, estérifiés, sulfatés ou liés à un sucre.

- Les protéolipides : constitués d'une protéine et d'une entité lipidique permettant l'insertion de la protéine dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique (**Hamamah *et al.* 1996; Jones 1998**).

II.1.4. Les différentes fractions du sperme

L'éjaculat du sperme comprend différentes fractions. Il est nécessaire de le recueillir totalement pour un bon examen du sperme:

- La fraction pré-spermatique : est la plus fluide, contient 5 à 20% du volume total et 5% des spermatozoïdes avec des sécrétions des glandes de Cowper et des glandes urétrales.

- La fraction spermatique : elle est la fraction principale de l'éjaculat, contient 30 à 50% du volume total avec la majorité des spermatozoïdes (46 à 80%). Les sécrétions proviennent de l'ampoule du canal déférent, de la prostate, des testicules et en partie des vésicules séminales.

- Une fraction post-spermatique : représente 13 à 32% du volume total, elle renferme les sécrétions des vésicules séminales. Elle peut aussi contenir les spermatozoïdes dont, majoritairement sont morts ou altérés (**Rives *et al.* 2012**).

II.1.5. La spermatogénèse

La spermatogénèse est le processus de différenciation cellulaire qui, à partir des cellules souches, aboutit à la production des spermatozoïdes. Elle est apparue à l'âge de la puberté. La spermatogénèse se déroule au sein de l'épithélium séminifère, où les cellules de Sertoli assurent un rôle de support architectural, de protection et de nutrition des cellules germinales. Elles assurent la régulation de la spermatogénèse et elles forment un microenvironnement indispensable au déroulement de ce processus (**Perrard *et al.* 2010**).

II.1.5.1. Les étapes de la spermatogénèse

a. La phase de multiplication : une spermatogonie se divise en deux cellules diploïdes appelées spermatocytes de premier ordre (I).

b. La phase d'accroissement : les spermatocytes de premier ordre (I) deviennent plus volumineux possédant des modifications de la chromatine. Ceci, correspond à la prophase de la première division de méiose.

c. La phase de maturation : le spermatocyte I se divise en deux spermatocytes de deuxième ordre (II) qui sont haploïdes, par une mitose réductionnelle. ils se transforment en spermatides qui ne se diviseront plus (Figure 3).

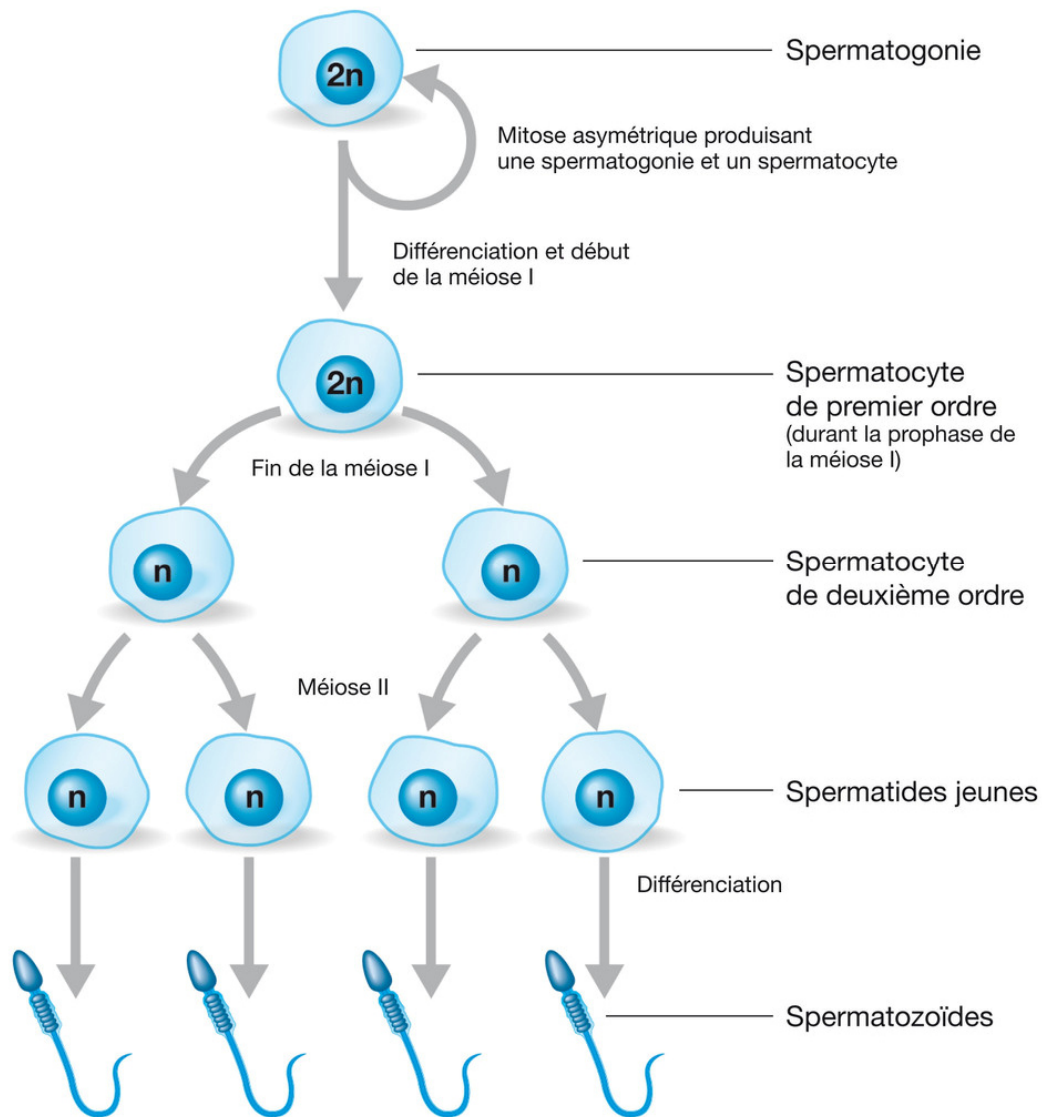


Figure 3: Les étapes de la spermatogenèse chez l'homme (Rives *et al.* 2012).

d. La spermiogenèse: c'est la dernière phase de différenciation, dont la spermatide se transforme en spermatozoïde mature. Il perd son cytoplasme superflu et il est doté d'une queue (Figure 4). Les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité ainsi que leur pouvoir fécondant au cours de la traversée de l'épididyme et du canal déférent. Ce pouvoir fécondant n'est d'ailleurs complet qu'après le parcours des voies génitales féminines (capacitation).

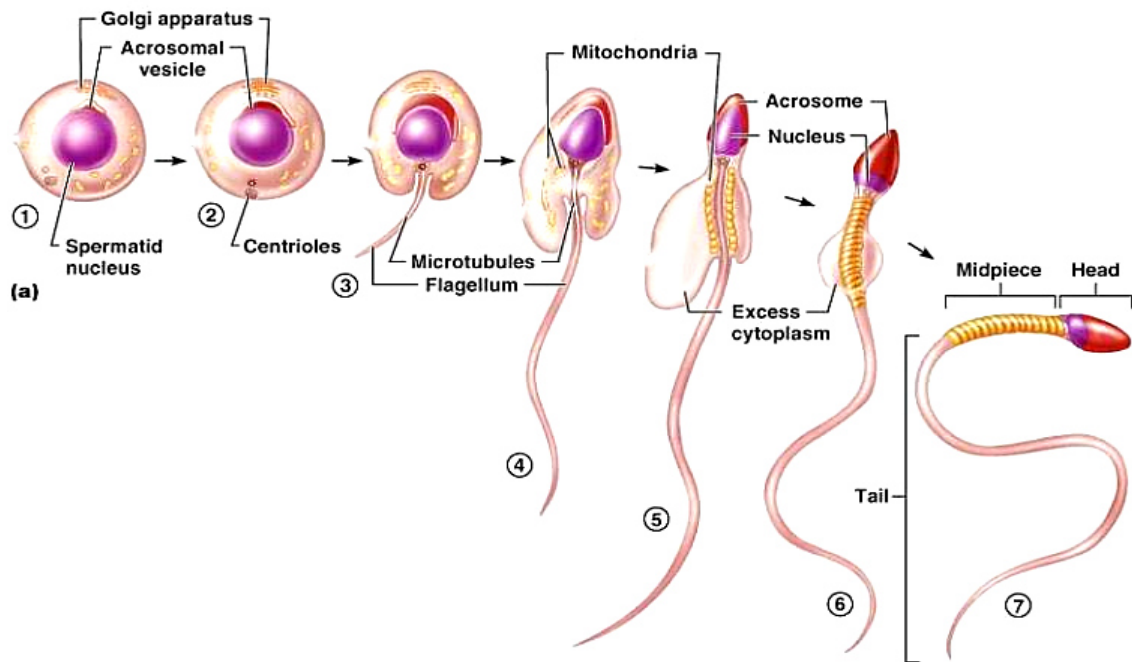


Figure 4: La transformation d'une spermatide en spermatozoïde pendant la phase de la spermiogénèse (Rives *et al.* 2012).

II.1.5.2. La régulation hormonale de la spermatogénèse

La spermatogénèse est régulée par des hormones hypothalamo-hypophysaires (la *gonadotropin-releasing hormone* « Gn-RH », la *luteinizing hormone* « LH » et la *follicle-stimulating hormone* « FSH »). Elle est aussi régulée par les facteurs de croissance et les cytokines synthétisés, sécrétés par les cellules somatiques testiculaires (cellules de Leydig, péricubulaires et de Sertoli) et les cellules germinales elles-mêmes, adsorbés ensuite par la matrice extracellulaire (Perrard *et al.* 2010).

II.2. La stérilité masculine

II.2.1. Définition de la stérilité

L'infertilité masculine est l'incapacité pour un homme de procréer en raison d'un défaut de son sperme, le plus souvent est définie par l'absence de conception après 24 mois de rapports sexuels. La stérilité masculine est donc une atteinte de l'individu dans son pouvoir de reproduction.

II.2.2. Classification de la stérilité

II.2.2.1. Selon le type d'infertilité

a. Infertilité masculine primaire : lorsque aucune grossesse dans le couple ne se manifeste.

b. Infertilité masculine secondaire : lorsque le couple a déjà au moins un enfant, c'est-à-dire quand une grossesse a déjà permis la naissance d'un enfant vivant ou viable.

c. Infertilité primo-secondaire : concerne quant à elle les couples où une grossesse a démarré mais sans naissance d'un enfant : c'est le cas des fausses couches.

II.2.2.2. Selon les anomalies spermatiques

a. Les anomalies de la quantité du volume spermatique

-Aspermie : elle se traduit par l'absence d'éjaculat ou un volume de sperme inférieur à 0,5 ml.

-Hypospermie : le volume total de l'éjaculat est inférieur à 1,5 ml.

-Hyperspermie : le volume total de l'éjaculat est supérieur à 6 ml (**Young 2016**).

b. Les anomalies du nombre de spermatozoïdes

-Azoospermie : se caractérise par l'absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat. Il existe deux types d'azoospermie : azoospermie sécrétoire et excrétoire (**Yamaguchi and Fujisawa 2011**).

-Oligospermie : définit par une diminution du nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat (inférieur à 15 millions par ml) (**Sharma and Agarwal 1996**).

-Polyspermie : elle se caractérise par un dénombrement des spermatozoïdes supérieur à 200 millions par ml (**Young 2016**).

-Cryptozoospermie : crypto c'est caché, donc il s'agit de l'absence de spermatozoïdes ou on trouve moins de 100000 spermatozoïdes dans la totalité de l'éjaculat (**Young 2016**).

c. Les anomalies de la qualité du sperme

-Asthénospermie : elle se définit par la présence de moins de 40% des spermatozoïdes mobiles une heure après l'éjaculation (**Young 2016**).

-Nécrozoospermie : elle se caractérise par la présence d'un très grand nombre de spermatozoïdes morts dans le sperme de l'homme. Il s'agit probablement d'un problème d'infection ou d'oxydation (**Young 2016**).

-Leucospermie : elle se définit par un dénombrement des leucocytes supérieur à 1 million/ml (**Lemkecher et al. 2005**).

-Tératospermie : elle se caractérise par un taux de spermatozoïdes normaux morphologiquement, inférieur à 15% (**Young 2016**).

II.2.3. Le bilan de l'infertilité masculine

Dans le but d'identifier tous les facteurs potentiels d'infertilité, une approche méthodique est nécessaire pour le diagnostic d'une infertilité masculine. Des examens cliniques, biologiques et radiologiques permettent d'évaluer le pronostic et les possibilités du traitement de l'infertilité.

II.2.3.1. L'interrogatoire

L'interrogatoire doit être méthodique, éventuellement structuré par l'utilisation d'un questionnaire-type, pour identifier tous les facteurs potentiels d'infertilité. Il précise tout d'abord la nature de l'infertilité : primaire ou secondaire en cas de paternité antérieure, sa durée, l'âge de la partenaire et les résultats des explorations et traitements déjà réalisés. Les conditions et la qualité de la sexualité du couple doivent également être étudiées : contexte psychologique et social, fréquence des rapports sexuels au moment de l'ovulation, présence ou non de troubles érectiles et/ou éjaculatoires, utilisation de lubrifiants potentiellement toxiques pour les spermatozoïdes (**Schlosser et al. 2006**).

II.2.3.2. L'examen clinique

L'examen est réalisé par l'évaluation de l'appareil génital : verge, testicule, épидидyme, déférent et prostate. Le volume testiculaire peut être évalué par l'orchimètre de Prader (système de boulier), l'orchimètre de Takihara (disques pleins évidés de taille croissante) ou un pied à coulisse (méthode de Sigman). Un testicule est dit hypotrophique pour un volume compris entre 6 et 15 ml, atrophique en deçà de 6 ml. L'asymétrie entre deux testicules est significative lorsqu'elle dépasse 30%.

L'absence uni- ou bilatérale de déférents et a fortiori de la queue de l'épididyme évoque d'emblée une malformation congénitale liée au gène CFTR. Le toucher rectal doit être systématique : une petite prostate peut être due à un déficit androgénique ; une induration ou des douleurs à une prostatite chronique. La recherche d'une varicocèle, presque exclusivement gauche, se réalise sur le patient couché puis debout, avec une manœuvre de Valsalva. Les petites varicocèles (grade I) ne sont palpées que debout, à la manœuvre de Valsalva, alors que les varicocèles de grade II sont spontanément palpables, celles de grade III visibles sous la forme d'une dilatation du scrotum (**Schlosser et al. 2006**).

II.2.3.3. Le bilan paraclinique de première intention

a. Spermogramme

Le spermogramme est un élément incontournable de l'évaluation de la fertilité masculine. Le recueil du sperme doit être réalisé au laboratoire, par masturbation, après un délai de 2 à 7 jours d'abstinence. Des valeurs de référence ont été définies par l'organisation mondiale de la santé (OMS) (**Schlosser *et al.* 2006; Moreau *et al.* 2018**).

L'interprétation du spermogramme est faite par la comparaison des valeurs trouvées et des valeurs de référence définies par l'OMS :

○ **Évaluation macroscopique**

- Volume d'éjaculat supérieur à 2 ml.

- pH de l'éjaculat supérieur ou égal à 7,2.

- La viscosité est semi-quantitative, évaluée par l'écoulement du sperme à l'extrémité d'une pipette (normale si le sperme s'écoule en gouttes séparées).

○ **Évaluation microscopique**

- Concentration des spermatozoïdes supérieure à 20 millions/ml ou nombre total de spermatozoïdes par éjaculat supérieur à 40 millions

- Mobilité suffisante des spermatozoïdes, appréciée en quantité et qualité dans l'heure suivant l'éjaculat. L'OMS a défini quatre grades de mobilité :

○ Mobilité normale, rapide et progressive.

○ Mobilité diminuée, lente ou faiblement progressive.

○ Mouvements sur place, non progressifs.

○ Spermatozoïdes immobiles.

- Le sperme doit contenir au moins 50% de spermatozoïdes à mobilité progressive (a+ b) ou plus de 25% à mobilité normale (a).

- Vitalité, appréciée par des colorants, supérieure à 75% à la première heure.

- Morphologie des spermatozoïdes normale dans plus de 30% des cas. La classification de David *et al.* est la plus utilisée. Elle précise le pourcentage, la localisation et le type des anomalies morphologiques des spermatozoïdes (tête, pièce intermédiaire ou flagelle), qu'elles soient isolées ou associées entre elles.

-Numération doit compter au moins 200 spermatozoïdes sur chaque cellule de Neubauer.

-Absence d'auto-agglutinats de spermatozoïdes dans l'éjaculat par test de réaction d'agglutination mixte anti-immunoglobulines.

b. spermocytogramme

Le spermocytogramme est l'examen de la morphologie des spermatozoïdes après coloration sur lames. La morphologie des spermatozoïdes est hétérogène entre les individus et chez un même individu qu'il soit fertile ou non. Si on regarde les données de la littérature sur plus de 30 ans de publications, l'origine et l'impact de nombreux traits ou « anomalies » morphologiques restent encore non élucidés probablement car il existe un caractère physiologique dans l'apparition de ces anomalies. Des études ont montré une corrélation entre le pourcentage de formes normales évalué au spermocytogramme et les chances de grossesse spontanées. Cependant, les valeurs prédictives du spermocytogramme sont faibles et les données les moins controversées sont celles qui concernent les anomalies monomorphes (Moreau *et al.* 2018).

II.3. Aspect de perturbation des fonctions génitales et gonadiques par les anticancéreux

Les traitements cytotoxiques altèrent la spermatogenèse en touchant les spermatogonies en division. Il en résulte une déplétion des cellules germinales et une altération de la production de spermatozoïdes. Les molécules de chimiothérapie pouvant altérer la fertilité masculine sont essentiellement les agents alkylants et les sels de platine (Poirot *et al.* 2013).

II.3.1. Les effets sur les caractéristiques testiculaires

Selon les résultats de plusieurs études, le poids testiculaire des sujets traités par les anticancéreux tels que le cyclophosphamide a été significativement réduit et les anomalies histopathologiques apparaissent ; ce qui est un indicateur clé de la toxicité sur la reproduction. Une diminution du poids testiculaire indique une diminution des cellules de la spermatogénèse et de capacité de la reproduction. En ciblant les cellules germinales par l'activation des voies apoptotiques et également par l'altération de la fonction des cellules de Sertoli (Allen *et al.* 2018). Cette diminution peut être attribuée à une altération de la sécrétion

de la testostérone et des gonadotrophines, qui conduit à l'arrêt de la spermatogénèse (**Ghobadi *et al.* 2017**).

II.3.2. Les troubles hormonaux

Le traitement par le cyclophosphamide peut réduire les taux sériques de la testostérone, de l'hormone lutéinisante (LH) et de l'hormone folliculo-stimulante (FSH). Aussi, il réduit l'activité des enzymes testiculaires, de formation de stéroïdes, tels que la 3B-hydroxstéroïde déshydrogénase (3B-HSD), la 17B-Hydroxstéroïde déshydrogénase (17B-HSD), P450scc et aromatasase. Cela peut être, du à des dommages oxydatifs induits par les agents anticancéreux et à des changements dans les modèles d'expression génique dans les cellules de Leydig (**Ghobadi *et al.* 2017**).

II.3.3. Les effets sur la morphologie et les caractéristiques des spermatozoïdes

Après le traitement par certains agents anticancéreux tels que le cyclophosphamide, une diminution significative de la concentration et de la motilité des spermatozoïdes, ainsi que d'autres anomalies, ont été observées. Les mécanismes comprennent l'induction de dommages sur l'ADN, la peroxydation des groupes thiols dans les protéines et la peroxydation des lipides membranaires. Aussi, le stress oxydatif des mitochondries et la réduction des enzymes impliquées dans le cycle de l'acide tricarboxylique ont été observées, réduisant ainsi l'adénosine triphosphate (ATP) disponible. De plus, il été démontré que l'exposition aux espèces réactives de l'oxygène (ERO) réduit la concentration de l'ATP et la motilité. De même qu'une réduction des protéines de choc thermique est à l'origine des anomalies des flagelles observées après le traitement (**Ghobadi *et al.* 2017**).

II.3.4. Les effets sur la spermatogénèse

Les effets délétères de la chimiothérapie sur la production de spermatozoïdes sont maintenant bien connus, entraînant un arrêt de la spermatogénèse qui se traduit (**Bujan and De Mas 2002**) :

- Par des altérations qualitatives des spermatozoïdes entraînant une stérilité ou des anomalies au niveau du noyau des spermatozoïdes, citant entre autre une azoospermie ou une oligospermie sévère transitoire ou parfois définitive.

- Par une atteinte des processus de fécondation entraînant une stérilité.

- Par des altérations au niveau du zygote, de l'embryon et éventuellement de l'enfant ainsi que des altérations comme cela a été démontré chez l'animal sur la première et la deuxième génération (**Bujan and De Mas 2002**).

Tableau 3 :Exemples de différents agents cytotoxiques et leur degré de gonadotoxicité (Vakalopoulos *et al.* 2015).

Groupe	Agent	Mode d'action	Degré de gonadotoxicité
Agents alkylants	Chlorambucil Cyclophosphamide Procarbazine Melphalan Carmustine Lomustine Busulfan Ifosfamide	Ajout de groupes alkyles à l'ADN, altérant la structure et la fonction de l'ADN	Azoospermie prolongée Azoospermie à l'âge adulte après traitement avant la puberté Azoospermie probable, mais administré avec d'autres agents stérilisants
Analogues du platine	Cisplatine Carboplatine	Formation d'adduits à l'ADN, des liens croisés entre les brins d'ADN	Azoospermie prolongée Azoospermie prolongée n'est pas souvent observée aux doses indiquées
Antibiotiques	Actinomycine-D Doxorubicine Bléomycine	Liaison à l'ADN inhibant la synthèse d'ARN Déclenchement de la topoisomérase II ADN dépendante Ruptures d'ADN simple et double brin	Azoospermie probable, mais toujours administrée avec d'autres agents stérilisants azoospermie, mais ne provoque que des réductions temporaires nombre de spermatozoïdes lorsqu'il est utilisé en solo Seulement des réductions temporaires du nombre de spermatozoïdes aux doses utilisées dans les schémas conventionnels, mais des effets additifs sont possibles
Antimétabolites	Fluorouracile 6-mécaptapurine Thioguanine Méthotrexate	Analogue pyrimidine Analogue de purine Analogue de purine Antifolate	Réductions temporaires de la numération des spermatozoïdes aux doses utilisées dans les schémas conventionnels, mais des effets additifs sont possibles
Dérivés de végétaux	Vincristine Vinblastine Etoposide	Inhibition de la formation de microtubules Inhibition de la topoisomérase II	Peut-être additif aux agents ci-dessus en provoquant une azoospermie, mais ne provoque que des réductions temporaires de nombre de spermatozoïdes lorsqu'il est utilisé seul Réductions temporaires du nombre de spermatozoïdes aux doses utilisées dans les schémas conventionnels.
Divers	Prednisone	Inhibition de la synthèse de l'ARN	Peu susceptible d'affecter la spermatogenèse

III. Le statut oxydatif dans le tractus génital masculin

III.1. Le stress oxydant

III.1.1. Les sources du stress oxydant

Le stress oxydant (SO) est défini comme un excès d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou une carence en antioxydants. Ce phénomène est lié à des dommages des spermatozoïdes causant une infertilité masculine. Il existe de nombreuses sources du SO et de l'inflammation (Figure 5), y compris la varicocèle, l'usage du tabac, l'alcool, l'obésité/syndrome métabolique, la leucocytospermie ainsi que les maladies sexuellement transmissibles et les infections virales (virus de l'immunodéficience humaine et l'hépatite) (Agarwal et al. 2018).

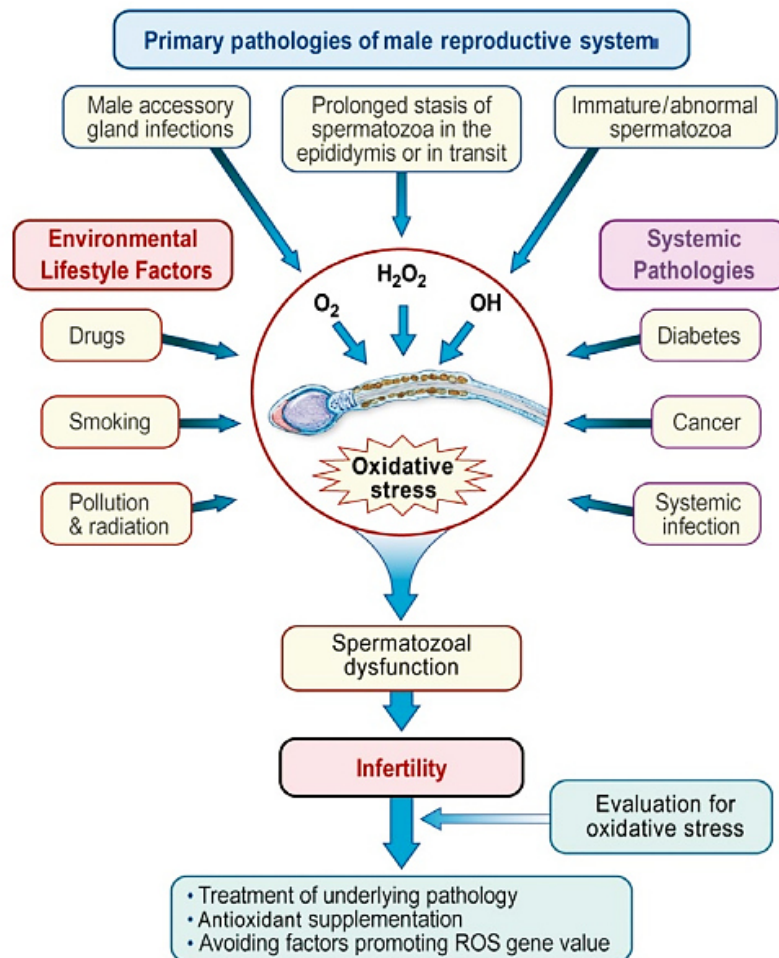


Figure 5: Les différentes sources du stress oxydatif (Agarwal et al. 2018).

III.1.2. Les effets du stress oxydant sur les composants cellulaires

Tous les composants cellulaires dont les lipides, les protéines, les acides nucléiques et les sucres sont des cibles potentielles du SO. L'ampleur des dommages induits par le SO dépend de la nature et de la quantité des ERO impliqués ainsi que sur la durée de l'exposition aux ERO. D'autres facteurs extracellulaires interviennent dans la production du SO tels que la température, la teneur en oxygène et la composition de l'environnement (par exemple les ions, protéines et piègeurs des ERO) (Agarwal *et al.* 2008).

III.1.2.1. Les effets sur l'ADN spermatique

Les ERO provoquent des dommages sur l'ADN sous forme des cassures d'ADN simple et double brin. Les ERO peuvent aussi provoquer des mutations génétiques telles que la mutation ponctuelle et le polymorphisme, entraînant ainsi une diminution de la qualité du sperme. D'autres mécanismes tels que la dénaturation et l'oxydation des paires de bases de l'ADN peuvent également être impliqués. Lorsque les dommages de l'ADN sont faibles, les spermatozoïdes peuvent réparer ces dommages. L'ovocyte est également capable de réparer l'ADN endommagé des spermatozoïdes. Par contre, si les dommages sont importants, une apoptose et une fragmentation embryonnaire peuvent survenir. Les dommages de l'ADN dans le chromosome Y peuvent également entraîner la suppression du gène SPY de la progéniture conduisant à l'infertilité (Agarwal *et al.* 2008).

III.1.2.2. Les effets sur la membrane spermatique

La membrane plasmique des spermatozoïdes contient des quantités élevées d'acides gras polyinsaturés (AGPI) qui contribuent à leur fluidité membranaire. Cependant, ces AGPI rendent les spermatozoïdes très sensibles aux dommages oxydatifs (Figure 6). L'oxydation des AGPI par les ERO génère un cycle de propagation appelé réaction en chaîne radicalaire dans laquelle les groupements à double liaison non conjugués des AGPI subissent une attaque électrophile initiale par les ERO. Cela, aboutit finalement à la formation de malondialdéhyde (MDA), 4-hydroxynonéanal (4-HNE) et acroléine. Ces aldéhydes réactifs sont des marqueurs du SO. Ces derniers affectent par la suite des acides aminés hydrophiles positifs des protéines, ce qui non seulement entraînera une production supplémentaire des ERO, mais provoquera également une dérégulation mitochondriale et une fuite des ERO de la membrane mitochondriale interne. Si la production des ERO dépasse les concentrations en antioxydants dans les spermatozoïdes, le SO se résulte. Le SO affecte l'intégrité de la membrane plasmique et induit une capacitation prématurée, ce

qui rend les spermatozoïdes moins aptes à la fécondation. Lorsque la concentration des ERO dépasse les besoins physiologiques, les spermatozoïdes subissent un SO, ce qui entraîne une infertilité (Agarwal *et al.* 2018).

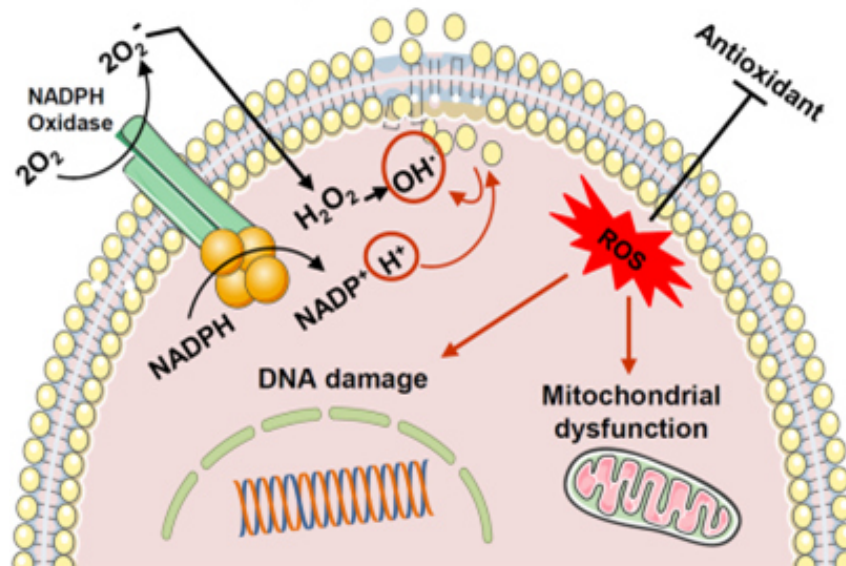


Figure 6: Le mécanisme de la peroxydation lipidique (Barati *et al.* 2020).

III.1.2.3. Les effets sur la motilité spermatique

L'augmentation des taux des ERO a été corrélée à une diminution de la motilité des spermatozoïdes. Cependant, le mécanisme exact par lequel cela se produit n'est pas élucidé. Il a été suggéré que le H_2O_2 se diffuse à travers les membranes dans les cellules et inhibe l'activité de certaines enzymes vitales telles que la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) via le shunt hexose monophosphate, qui contrôle la disponibilité intracellulaire du NADPH. Ce dernier est ensuite utilisé comme source d'électrons par les spermatozoïdes pour alimenter la génération des ERO par un système enzymatique appelé NADPH oxydase (Figure 7). Comme, il a été aussi proposé d'impliquer une série d'événements interdépendants qui entraînent une diminution de la phosphorylation des protéines axonémiques et de l'immobilisation des spermatozoïdes. Ces deux phénomènes sont associés à une réduction de la fluidité membrane, nécessaire à la fusion spermatozoïde-ovocyte (Agarwal *et al.* 2008).

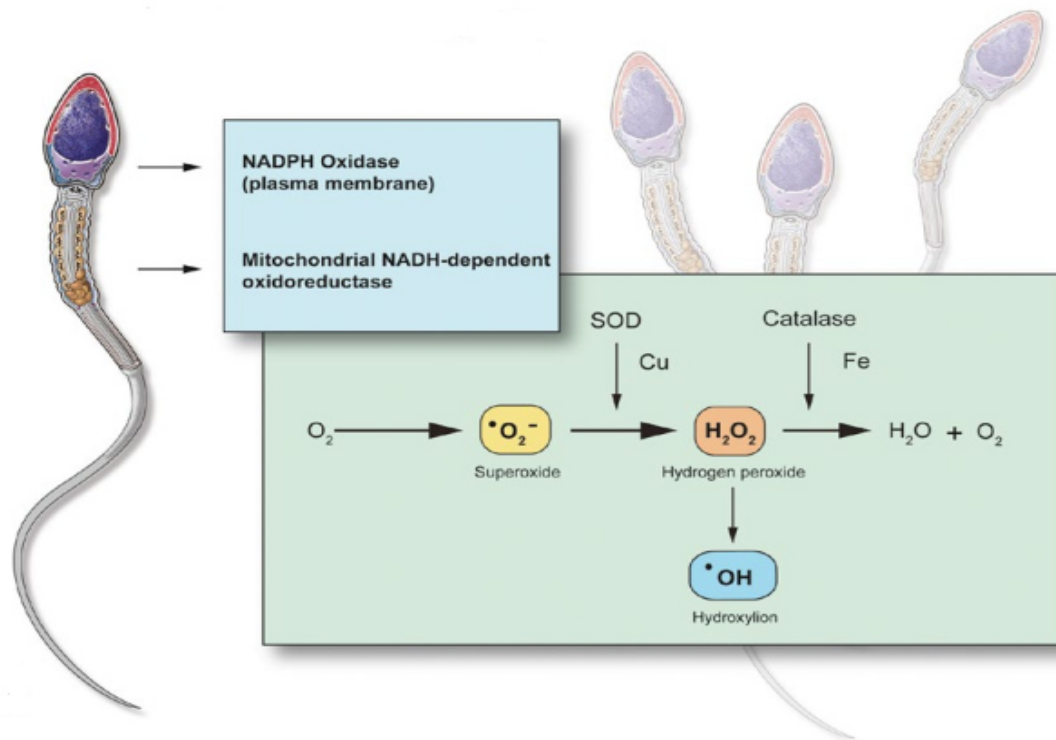


Figure 7: Génération des dérivés actifs de l'oxygène (Agarwal *et al.* 2018).

III.1.3. Les méthodes de mesure du stress oxydatif dans le sperme

Il existe plusieurs méthodes pour détecter le stress oxydatif et les antioxydants soit directement ou indirectement on mesurant les produits d'oxydation. La production des ERO par les cellules germinales et/ou les PNN sont dosés comme suit (Pons-Rejraji *et al.* 2009) :

- Par chimiluminescence, à l'aide d'un luminomètre et en utilisant le luminol ou la lucigénine comme substrat.

- Par coloration au nitrobluetetrazolium (NBT), qui produit un pigment bleu observable en microscopie photonique.

- Par des techniques simples et rapides assemblant la cytométrie en flux ou la microscopie photonique, généralement à épifluorescence et des sondes adaptées permettent une bonne estimation de la proportion de spermatozoïdes ayant subi un SO et/ou localiser les sites d'oxydation.

- Par le marquage des peroxydes lipidiques par le C11-BODIPY, ainsi que l'immuno-détection du 8- hydroxy-2-déoxyguanosine (8-OH-dG), produit de l'oxydation d'acides nucléiques sont les méthodes les plus fréquemment citées dans les travaux récents. Le taux

de résidus thiols, le malondialdéhyde (MDA) ou le 4-hydroxy-2-nonenal, deux produits majeurs de la peroxydation lipidique, sont couramment quantifiés par spectrophotométrie ou par HPLC.

III.2. La protection par les antioxydants

Le testicule est très sensible aux dommages oxydatifs en raison de l'abondance des générateurs des ERO (xanthine oxydase, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate « NADPH » oxydase et chaîne de transport d'électrons mitochondriale) et des concentrations élevées d'AGPI. Cependant, le système antioxydant joue un rôle crucial dans la protection de ce tissu contre les dommages oxydatifs causant un dysfonctionnement testiculaire (Ghobadi *et al.* 2017).

III.2.1. La définition des antioxydants

Les antioxydants sont des substances chimiques qui sont naturellement présentes dans certains aliments. La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Dans le système de défense antioxydant de notre organisme, on distingue des systèmes enzymatiques et des systèmes non enzymatiques. Ces substances antioxydantes aident à la protection des cellules de l'organisme. Il existe plusieurs types d'antioxydants dont des oligo-éléments, des micronutriments ainsi que certaines vitamines, comme les vitamines C et E (Barati *et al.* 2020).

III.2.2. Les types des antioxydants

III.2.2.1. Les antioxydants enzymatiques

Les enzymes antioxydantes sont présentes le long du tractus génital masculin, ainsi que dans le liquide séminal et les spermatozoïdes. On distingue trois enzymes (Barati *et al.* 2020) :

- Le superoxyde dismutase (SOD) qui accélère la dismutation des O_2^- en H_2O_2 et en O_2 , sa quantité et son activité ne sont que très faiblement réduites chez les hommes stériles.

- La catalase (CAT), est un faible agent protecteur qui catabolise le H_2O_2 en H_2O et son affinité pour le H_2O_2 est faible.

- Les glutathions peroxydases (GPX) sont plus efficaces aux concentrations physiologiques. Ils réduisent le H_2O_2 et divers hydroperoxydes lipidiques. D'ailleurs,

l'inhibition spécifique des GPX *in vitro* induit une peroxydation lipidique importante dans les spermatozoïdes.

III.2.2.2. Les antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques présents dans le liquide séminal sont de différentes natures incluant, des vitamines (C et E), les dérivés des acides aminés (taurine et hypotaurine), des protéines et peptides (albumine et glutathion), des caroténoïdes, des flavonoïdes, des métaux lourds de transition (zinc et manganèse), du sélénium, de la carnitine et des vésicules lipidiques d'origine prostatique. Leur activité est significativement diminuée dans le liquide séminal des hommes infertiles, reflétant un rôle majeur dans la protection des spermatozoïdes (**Barati et al. 2020**). Ces antioxydants agissent à différents niveaux cellulaires et selon différents modes d'action. La plupart captent ou transforment les ERO en piégeant ou en donnant des électrons. Les antioxydants plus indiqués sont :

a. La vitamine E

La vitamine E est un antioxydant majeur de l'interruption de la chaîne de peroxydation des membranes du spermatozoïde et semble avoir un effet dépendant de la dose. Elle élimine les trois types de radicaux libres, à savoir le superoxyde, H₂O₂ et les radicaux hydroxyles. L'administration de 100 mg de vitamine E trois fois par jour pendant 6 mois dans un groupe de patients asthénozoospermiques avec des partenaires féminines normales a démontré une diminution significative de la peroxydation lipidique, une augmentation de la motilité spermatique ainsi que des cas de grossesse (**Agarwal et al. 2008**). Cependant, l' α -tocophérol est une vitamine liposoluble, instable et peu soluble dans les milieux aqueux. Une stratégie pour l'amélioration de sa stabilité et sa solubilité consiste à son encapsulation dans les cyclodextrines (**Sueishi et al. 2012**).

b. La vitamine C

La vitamine C est un antioxydant efficace qui neutralise les radicaux hydroxyles, superoxyde et peroxyde d'hydrogène empêchant ainsi l'agglutination des spermatozoïdes. Il inhibe la peroxydation des lipides, recycle la vitamine E et protège contre les dommages de l'ADN induits par le H₂O₂ (**Agarwal et al. 2008**).

c. La coenzyme Q10

La coenzyme Q10 est un antioxydant non enzymatique qui est lié aux lipoprotéines de basse densité. Elle protège contre les dommages peroxydants. C'est un agent fournissant de l'énergie et améliore la motilité des spermatozoïdes. Elle est présente dans la pièce intermédiaire du spermatozoïde, recycle la vitamine E et empêche son activité pro-oxydante. Il a été démontré qu'une supplémentation orale de 60 mg/jour de la coenzyme Q10 améliore le taux de fécondation, en utilisant une injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) chez les hommes stériles normospermiques (**Agarwal *et al.* 2008**).

III.2.3. Le mode de protection par les antioxydants

Les ERO les plus abondantes sont formées au cours du métabolisme et phosphorylation oxydative. L'oxygène pourrait être davantage converti en $\cdot\text{OH}$, qui est un radical plus oxydant. Les cellules utilisent diverses stratégies pour la neutralisation et l'élimination des ERO produites. Les principaux antioxydants sont constitués de molécules telles que le glutathion (GSH), les vitamines E et C, des protéines antioxydantes telles que la thiorédoxine, la glutarédoxine, les métallothionéines (MT) et l'albumine ainsi que des antioxydants enzymatiques tels que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPX) (**Ghobadi *et al.* 2017**).

III.2.3.1. Le rôle des antioxydants dans la motilité spermatique

Les antioxydants tels que la vitamine E et C, le glutathion, la N-acétylcystéine, la SOD, la catalase, l'albumine, la taurine et l'hypotaurine empêchent la diminution de la motilité des spermatozoïdes. Aussi, la N-acétylcystéine et la coenzyme Q10 augmentent la motilité de ces derniers. L'incubation d'un échantillon de sperme provenant d'un mâle asthénozoospermique pendant 24 h avec 50 ml de la coenzyme Q10 a amélioré la motilité de ses spermatozoïdes. Comme, il a été démontrés que la supplémentation orale de 2 à 3 g/jour de carnitine pendant plus de 2 mois a amélioré la concentration et la motilité des spermatozoïdes (**Agarwal *et al.* 2008**).

III.2.3.2. Le rôle des antioxydants dans la prévention des dommages de l'ADN des spermatozoïdes

Il a été démontré que les antioxydants diminuent la fragmentation de l'ADN induite par l'OS. Une supplémentation orale quotidienne de 1 g de vitamines C et E pendant 2 mois a réduit le nombre de spermatozoïdes positifs par la méthode TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTPnick end labeling) de 22,1% à 9,1% tandis que la

quantité de spermatozoïdes présentant des fragmentations de l'ADN est restée la même dans le groupe placebo (22,4 à 22,9%). De plus, une nette amélioration des cas de grossesse clinique (48,2% contre 6,9%) et d'implantation (19,6% contre 2,2%) après le traitement antioxydant par rapport aux résultats avant le traitement de l'ICSI. Une supplémentation de vitamine E ou C au milieu de préparation du sperme pendant la séparation par gradient de densité a protégé le sperme des dommages de l'ADN. Par ailleurs, l'albumine aide également à neutraliser les dommages causés par le peroxyde lipidique sur la membrane plasmique et l'ADN du spermatozoïde (**Agarwal *et al.* 2008**).

III.2.3.3. Le rôle des antioxydants dans la prévention des cryodommages

Les procédures de congélation et de décongélation des spermatozoïdes entraînent une diminution significative et irréversible de la motilité et de l'activité métabolique des spermatozoïdes. Ainsi, une perturbation de la membrane plasmique a été observée. Il a été démontré que la vitamine E (10 mmol/l) et le Rebamipide (300 mmol/l) diminuent les risques de congélation-décongélation et améliorent la motilité après décongélation. La supplémentation *in vitro* de 300 mmol/l de Rebamipide dans un échantillon de sperme pendant l'incubation (37 C°) et la cryoconservation (-196 C°) a une durée de 3 jours a démontré une diminution significative du taux des ERO produites (**Agarwal *et al.* 2008**).

Partie pratique

I. Matériel et méthodes

Le but de ce travail est d'étudier l'impact direct des molécules anticancéreuses sur spermatozoïdes matures et aussi d'évaluer l'effet protecteur des antioxydantes à l'égard de l'effet délétère de ces molécules anticancéreuses. Ce travail est réalisé au niveau du laboratoire Associé en Ecosystèmes Marins et Aquacoles de la faculté SNV de l'université A/Mira de Bejaia.

Comme la période pratique a coïncidé avec le mois de Ramadan, nous n'avons pas pu réaliser notre travail sur le sperme humain. Des études antérieures ont déjà démontré que la cellule spermatique du bélier présente une réponse similaire à celle des autres mammifères dont l'espèce humaine (**Boumenir *et al.* 2018**), donc nous avons décidé de travailler sur le sperme de bélier en raison de sa disponibilité.

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel biologique

Le sperme épидидymaire a été collecté à partir des testicules de bélier ; ces rangeons blancs ont été récupéré auprès de l'abattoir communal de Bejaia juste au moment de l'abattage. Ces derniers sont transportés sous température ambiante au laboratoire.

I.1.2. Produits chimiques et appareillage

Le tableau 4 illustre les différents matériels utilisés pour la réalisation du travail pratique ainsi que leur provenance correspondante.

Tableau 4 : Les produits et le matériel utilisés dans les expérimentations.

	Le produit	La firme
Le tampon tris	Tris (Hydroxymethyle aminomethane)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
	Fructose	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
	Acide citrique	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
	Pénicilline	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Les anticancéreux	Carboplatine (CBCDA)	Mylan 10 mg/ml
	Paclitaxel (TXL)	Cipla 6 mg/ml
Les antioxydants	Vitamine C	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
	Vitamine E	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

A suivre

Suite tableau 4

Appareillage	Thermomètre	/
	Microscope	Nikon eclipse E200, Japan
	Bain-marie	Bunsen
	Plaque chauffantes	Raypa
	Le système CASA	SyncMaster SA100
	La chambre Makler®	Sefi Medical Instrument, Haifa, Israël
	Agitateur	VELP scientifica
	Balance analytique	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
	Vortex	VELP scientifica
Le petit matériel	Eppendorfs	/
	Micropipettes	Accumax
	Embouts	/
	Seringues de 10 ml	/
	Lame tranchante	/
	Spatule	/
	Bicher	/

I.1.3. Système CASA

Le CASA est un système d'analyse du sperme assistée par ordinateur (Figure 8). Il permet une analyse automatique, répétitive et précise d'un échantillon de spermes selon les paramètres suivants: mobilité, concentration, morphologie, fragmentation de l'ADN, vitalité, la réaction de l'acrosome et leucocytes. Il contient aussi une chambre de comptage « Makler » permettant de déposer un volume (10 µl) de sperme qui sera ensuite analysés sous microscope à contraste de phase. Les images sont capturées à l'aide d'une caméra vidéo.



Figure 8 : Photo de l'analyseur CASA.

I.2. Méthodes

I.2.1. Préparation de la solution TRIS

Une solution TRIS a été préparé avec du TRIS « hydroxyméthyl aminomethane » (3,028 g), du fructose (1,25 g), de l'acide citrique (1,7 g) et de la pénicilline (100 mg) dans 100 ml de l'eau distillée (Taouzinet *et al.* 2020).

I.2.2. Collecte du sperme épидидymaire

Avec la méthode «Rétrograde-Flushin» et à partir des testicules du Bélier, la semence contenue dans la région caudale de l'épididyme a été récupéré par les étapes suivantes :

- Rinçage du testicule avec de l'eau pour l'élimination du sang.
- Élimination des tissus qui englobe l'épididyme et le testicule par une lame tranchante, en prenant la précaution de ne pas abimer le canal épидидymaire et le canal déférent.
- Isoler l'épididyme du reste du testicule (en sectionnant le canal épидидymaire et en préservant le canal déférent) puis épurer les tissus en excès du canal déférent.
- Rinçage de l'épididyme avec de l'eau physiologique ou avec la solution TRIS et le sécher avec le papier absorbant.
- Évacuer le sang au maximum possible dans la partie caudale dans la tête de l'épididyme, suivie par un rinçage pour éviter toute contamination de la semence par le sang.
- Réaliser une incision au niveau de la tête puis en implique une pression par l'introduction d'une seringue remplie de 0,5 ml d'eau physiologie ou de la solution TRIS dans la lumière du canal déférent (en exerçant une pression légère et continue sur le piston de la seringue).
- Enfin, récupérer la semence dans un Eppendorf placé sous l'incision (Figure 9).



Figure 9: La méthode de la collecte de la semence à partir du testicule du Bélier.

I.2.3. Préparation des solutions d'anticancéreux et d'antioxydants

Les anticancéreux utilisés ont été récupéré au niveau du service d'oncologie de l'EPH de Bouira, puis transportés au laboratoire et conservés à température ambiante.

L'étude de l'effet des anticancéreux sur les spermatozoïdes matures est réalisée en utilisant les concentrations suivantes: CBDCA (5 mg/ml) et TXL (0,6 mg/ml). Ces concentrations sont choisies tout en respectant la fourchette des doses administrées en clinique humaine.

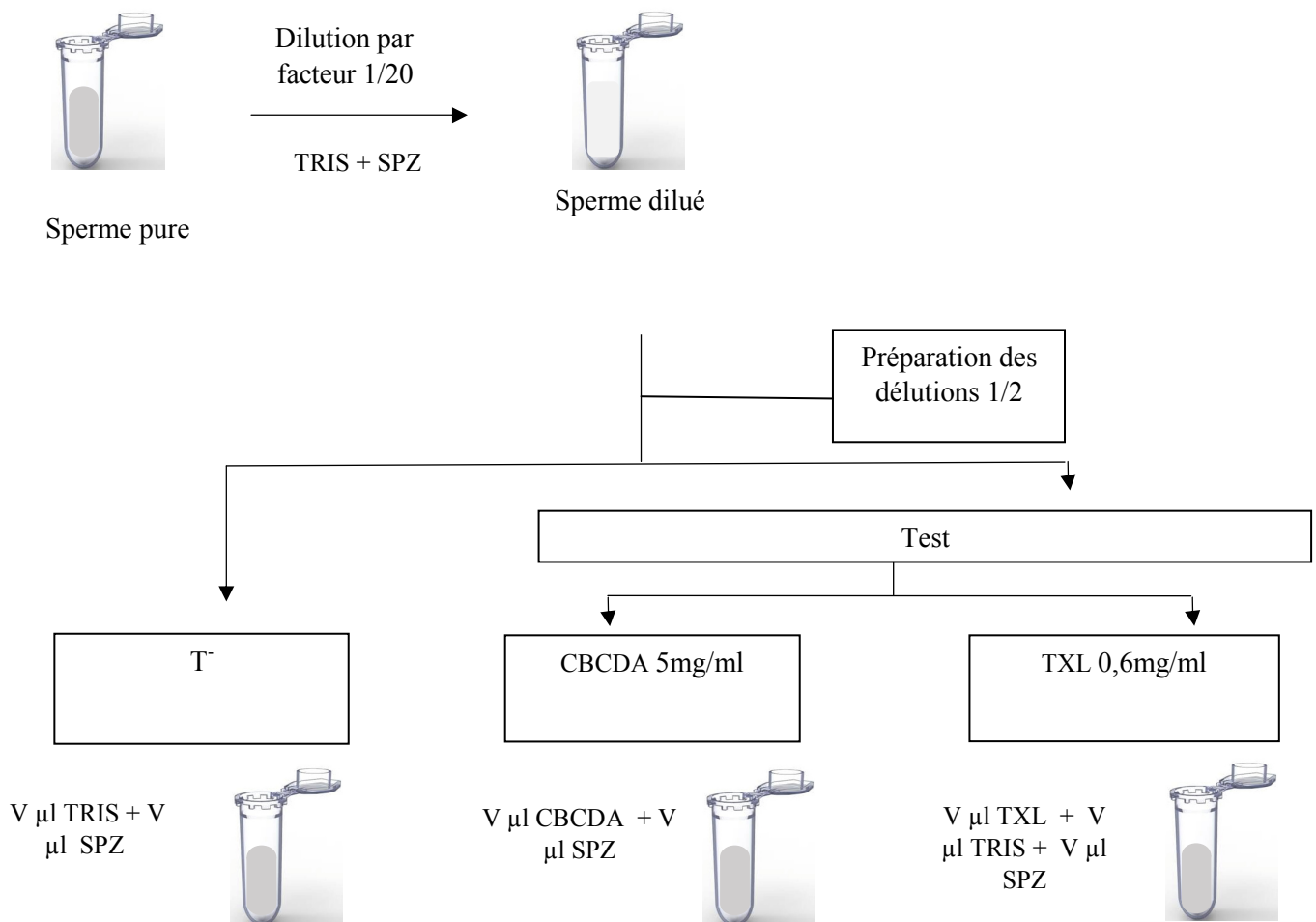
Les concentrations des médicaments anticancéreux utilisés dans les expériences suivantes étaient celles considérées comme appropriées d'un point de vue pharmacologique et physiologique pour les doses thérapeutiques humaines (**Mameri *et al.* 2021**).

Pour étudier l'effet protecteur des antioxydants, nous avons utilisé les molécules suivantes, préparées dans la solution TRIS :

- La vitamine C à une concentration de 0,1 mg/ml.
- La vitamine E à une concentration de 0,25 mg/ml.
- La combinaison de ces deux vitamines a été envisagée.

I.2.4. Étude de l'impact direct des anticancéreux sur les spermatozoïdes

Le sperme frais collecté a été pré-dilué 1 : 20 (v/v) à l'aide de la solution TRIS pour avoir une concentration d'environ 120 millions de spermatozoïdes/ml déterminé par le système CASA. Un volume de spermatozoïde a été mis en contact avec les anticancéreux (CBCDA et TXL) à la concentration désirée. La figure 10 retrace les différentes étapes du protocole utilisé :



A suivre

Suite figure 10

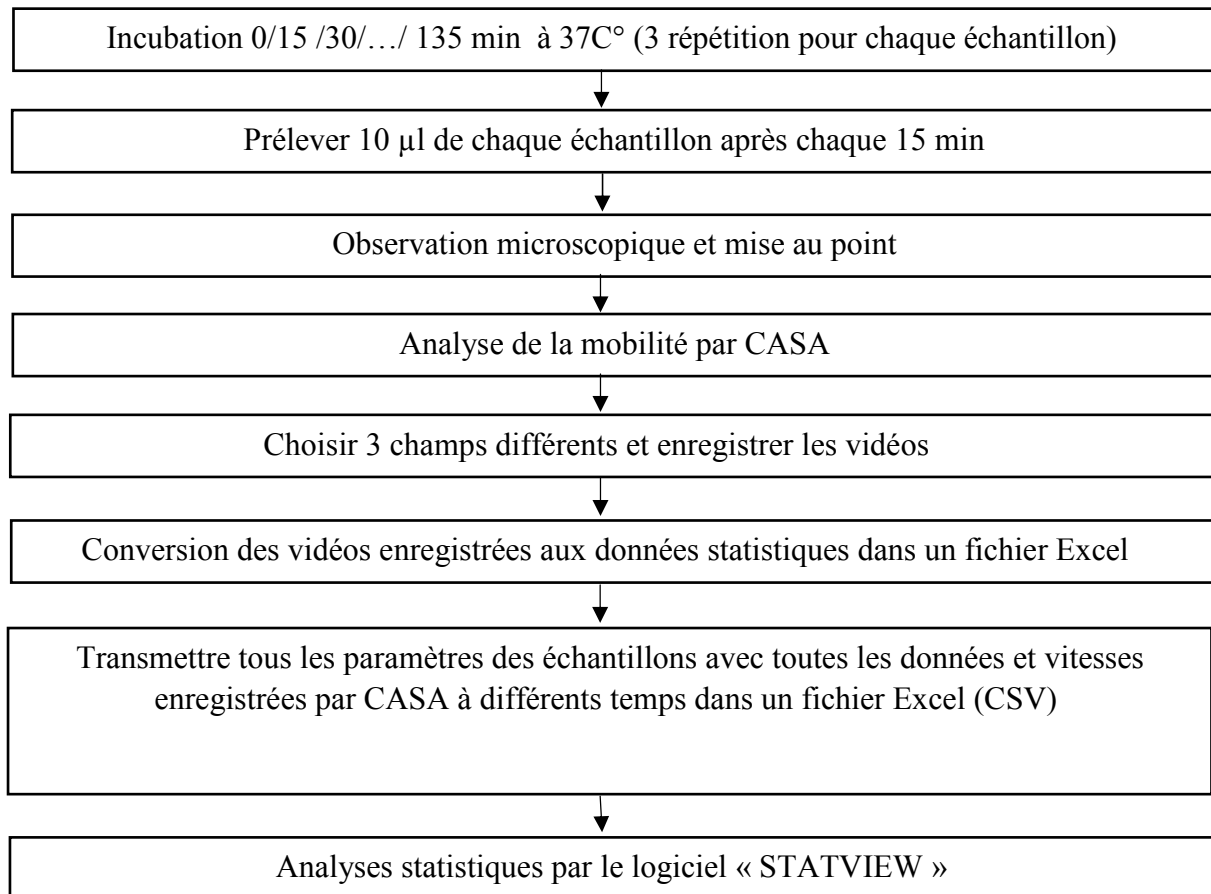
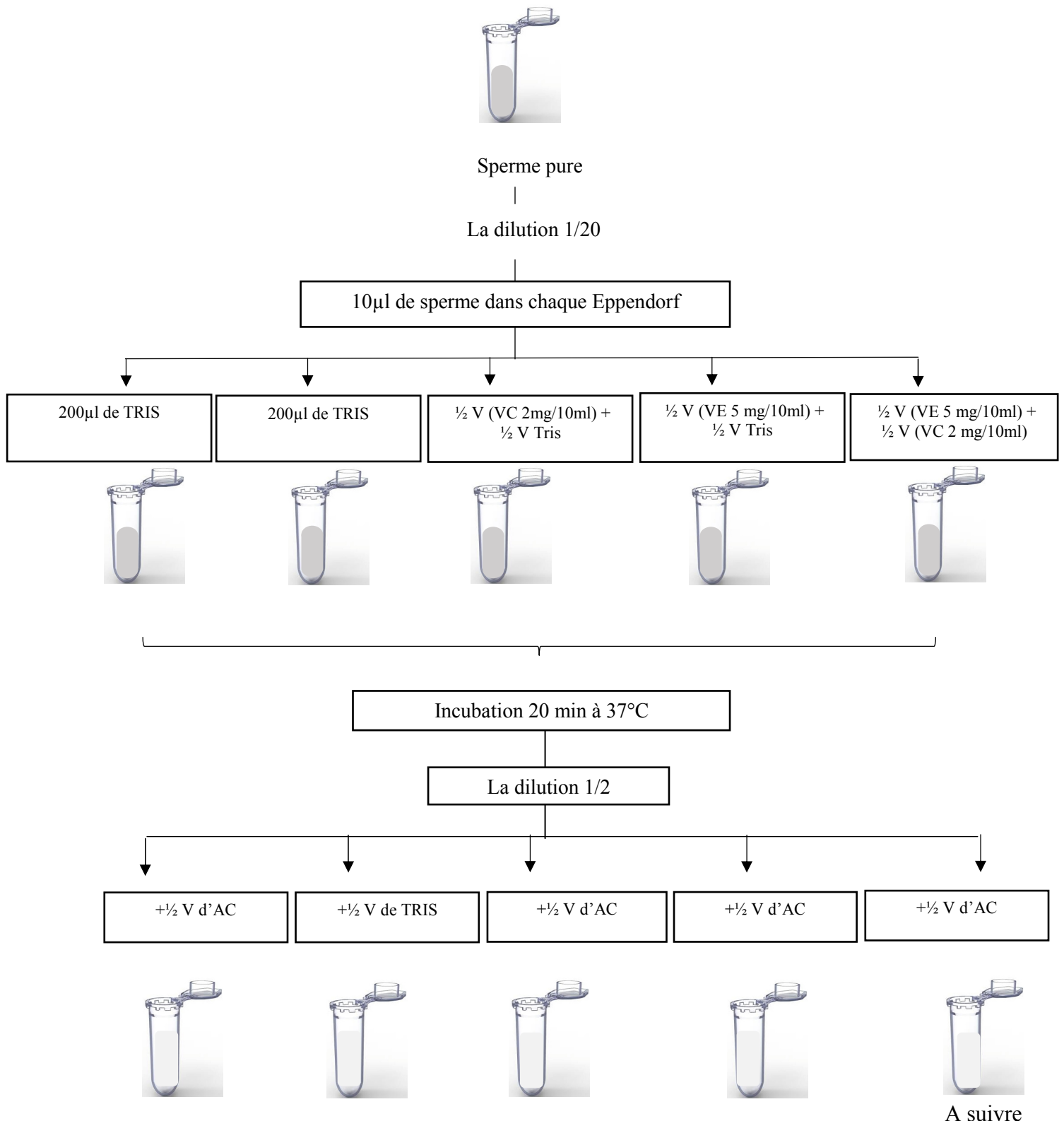


Figure 10 : Le protocole d'étude de l'impact direct des anticancéreux sur les spermatozoïdes du Bélier. SPZ : spermatozoïdes, T⁻ : témoin négatif, CBCDA : carboplatine, TXL : paclitaxel.

I.2.5. Étude de l'effet protecteur des antioxydants à l'égard de l'effet délétère des anticancéreux sur les spermatozoïdes

Afin d'étudier l'effet protecteur des vitamines E et C seules ou en association contre les dommages engendrés par le CBCDA et le TXL, un protocole expérimental a été validé dont ses différentes étapes sont résumées dans la figure 11.



A suivre

Suite figure 11

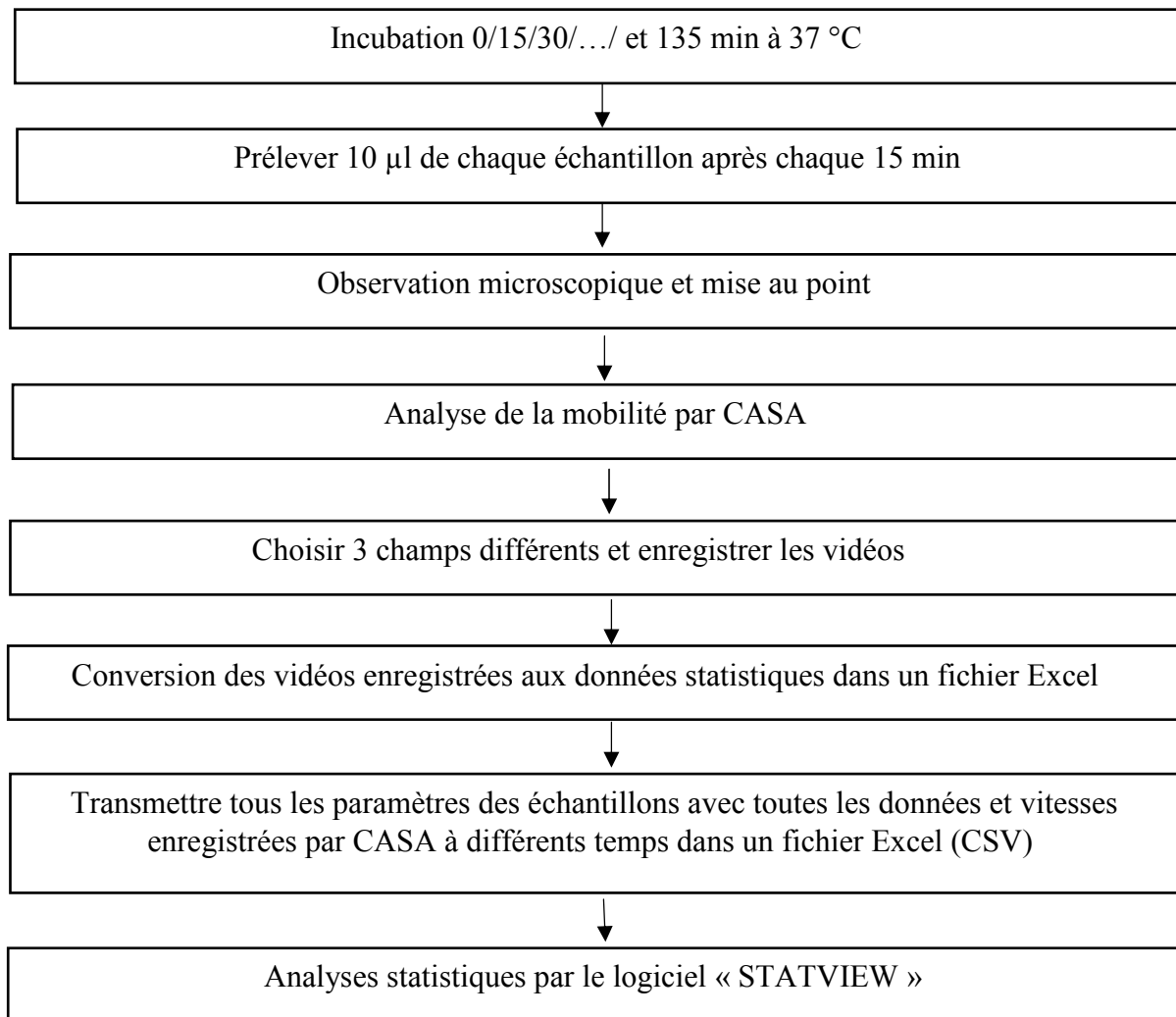


Figure 11 : Le protocole d'étude de l'effet protecteur des antioxydants contre les dommages engendrés par les anticancéreux sur les spermatozoïdes du Bélier. AC : les anticancéreux (CBCDA ou TXL), VE : volume de la vitamine E, VC : volume de la vitamine C.

I.2.6. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm SD. Les données expérimentales ont été analysées par le logiciel « STATVIEW : SAS Institute Inc. Version 5 ».

II. Résultats

Dans cette partie, nous présenterons l'ensemble des résultats des deux approches: étude de l'induction des dommages par l'impact des anticancéreuses sur les spermatozoïdes matures *in vitro*, ensuite l'étude de la protection par les antioxydants.

Il est admis que la mobilité de la cellule spermatique est révélatrice de son état physiologique et des impacts négatifs qu'elle subit. L'analyse informatique (CASA) permet de générer des résultats quantitatifs et de produire ainsi des résultats objectifs permettant de mettre en évidence l'impact des différents traitements sur la qualité du sperme. Parmi ces critères les paramètres de la mobilité spermatique sont retenus à savoir:

- La vitesse moyenne du trajet (VAP): est la vitesse moyenne de la tête du spermatozoïde sur sa trajectoire moyenne.

- La vitesse en ligne droite (VSL): est la vitesse moyenne de la tête du spermatozoïde à travers la ligne droite reliant la première position de la dernière piste.

- La vitesse curviligne (VCL): est la vitesse moyenne de la tête du spermatozoïde sur son trajet réel (Figure 12).

- Le pourcentage des progressifs rapides (% PR): est la mobilité fléchante et rapide dont la vitesse de spermatozoïde est supérieure à 25 $\mu\text{m/s}$.

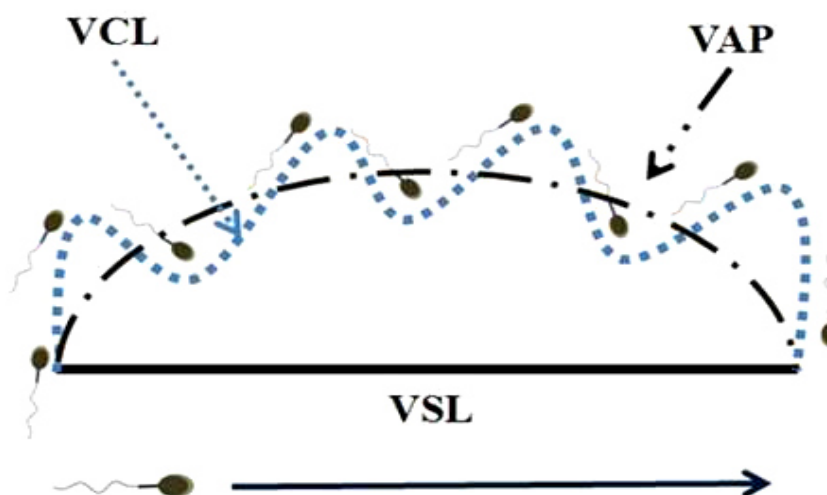


Figure 12: Diagramme expliquant certains paramètres cinétiques du sperme. VCL : vitesse curviligne, VSL : vitesse en ligne droite, VAP : vitesse moyenne du trajet.

II.1. Effets des anticancéreux sur la motilité de spermatozoïdes

Après avoir traité les spermatozoïdes par les anticancéreux, la mobilité a été analysée après 0 min, 15 min, 30 min, ...135 min d'incubation.

Une différence significative a été observée dans les paramètres de la motilité entre le contrôle négatif (TRIS) et les anticancéreux testés (CBCDA et TXL). La figure 13 montre une diminution significative pour tous les paramètres de mobilité des spermatozoïdes traités par les anticancéreux (TXL, CBCDA) comparés au contrôle durant tous les temps d'incubation, ce qui indique un effet délétère sur la motilité spermatique. Toutefois, une diminution de ces paramètres est plus remarquable après 45 min d'incubation avec le TXL (VCL= 21,96±1,45 $\mu\text{m/s}$; VSL= 4,64±0,67 $\mu\text{m/s}$; VAP= 9,34±0,79 $\mu\text{m/s}$) où la plupart des spermatozoïdes sont statiques, ce qui indique un effet proportionnel au temps (temps dépendant) sur les spermatozoïdes matures. Par contre, cet effet est moins délétère lors de l'incubation avec le CBCDA (VCL= 45,56±0,76 $\mu\text{m/s}$; VSL= 9,43±0,23 $\mu\text{m/s}$; VAP= 19,62±0,35 $\mu\text{m/s}$). Par conséquent, la mobilité des spermatozoïdes exposés au TXL est inférieure à celle des spermatozoïdes exposés au CBCDA.

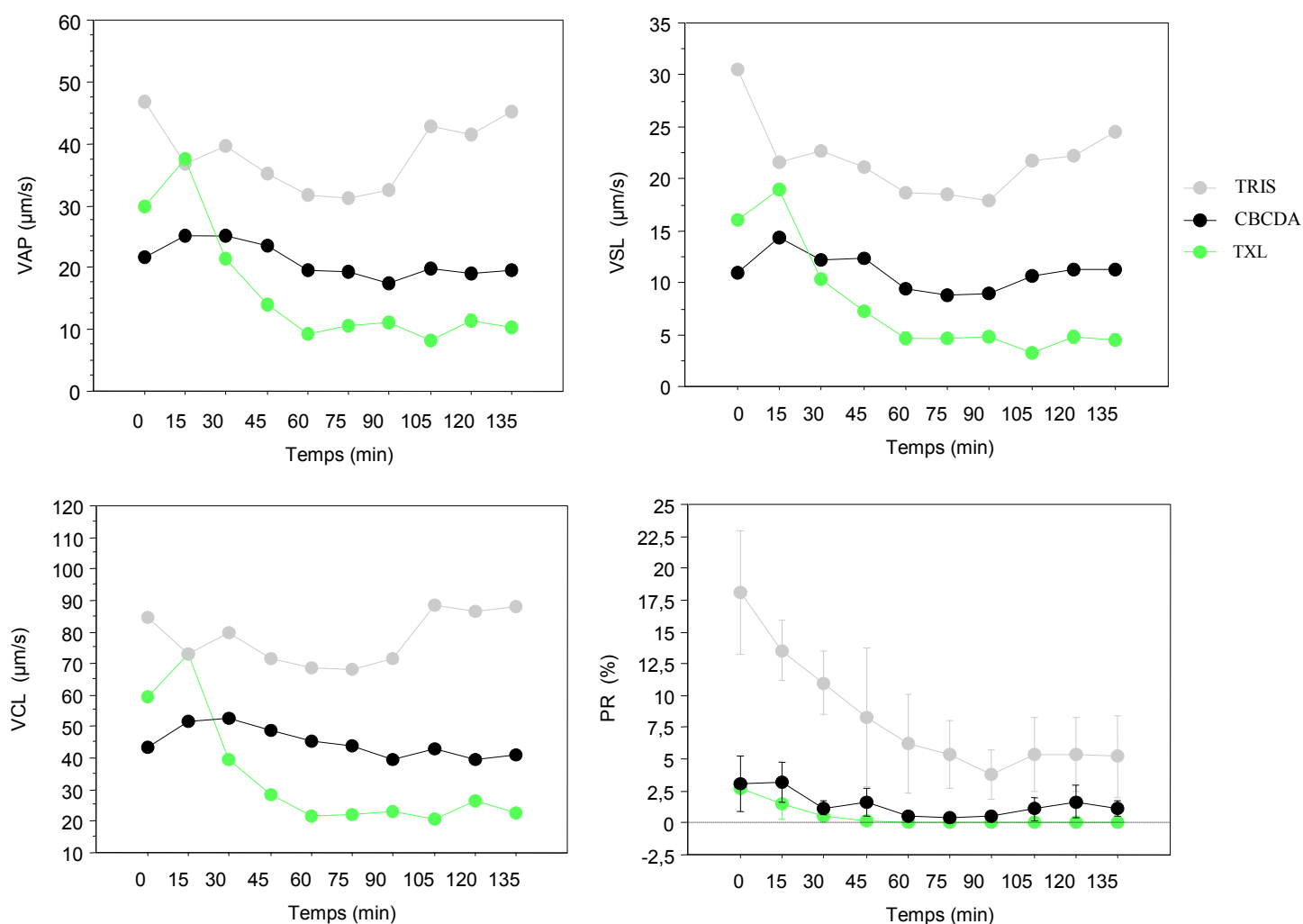


Figure 13 : Les paramètres de mobilité spermatique (VAP, VSL, VCL et le % des PR) après incubation des spermatozoïdes avec les anticancéreux TXL et CBCDA pendant (0 min, 15 min, 30 min, ...135 min). TRIS : témoin négatif, CBCDA : carboplatine (5 mg/ml), TXL : paclitaxel (0,6 mg/ml).

II.2. Effet protecteur des antioxydants contre l'effet délétère de CBCDA sur les spermatozoïdes

Une différence dans les résultats des paramètres de motilité spermatique a été observée entre le contrôle négatif, le CBCDA, et les antioxydants testés (VIT C, VIT E et VIT C + E). Les résultats montrent qu'aucune différence significative n'a été observée dans les paramètres de motilité des spermatozoïdes entre les groupes CBCDA, VIT C et VIT E (Figure 14). Cependant, la motilité des spermatozoïdes a été significativement élevée dans la combinaison de la VIT E et C (VCL entre $42,94 \pm 0,56$ et $62,87 \pm 0,50$ $\mu\text{m/s}$; VSL entre $14,04 \pm 0,21$ et $16,47 \pm 0,3$ $\mu\text{m/s}$; VAP entre $21,1 \pm 0,3$ et $30,99 \pm 0,37$ $\mu\text{m/s}$) par rapport au groupe traité par le CBCDA seul (VCL entre $28,51 \pm 0,95$ et $33,84 \pm 0,95$ $\mu\text{m/s}$; VSL entre $12,03 \pm 0,51$ et $16,61 \pm 0,42$ $\mu\text{m/s}$; VAP entre $12,17 \pm 0,56$ et $14,47 \pm 0,61$ $\mu\text{m/s}$).

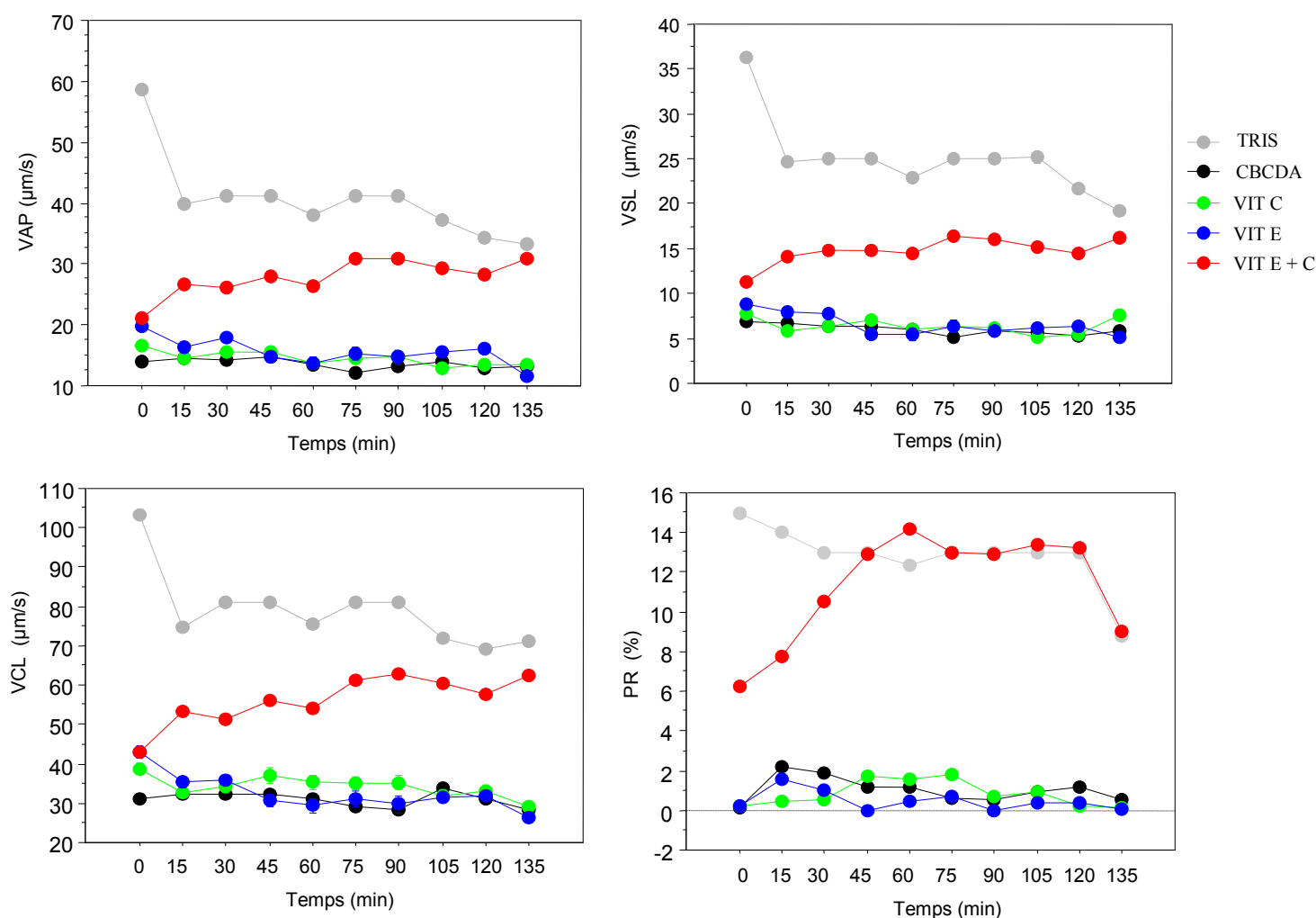


Figure 14 : Les paramètres de mobilité des spermatozoïdes (VAP, VSL, VCL et le % des PR) après incubation avec le CBCDA prétraités par les antioxydants (0 min, 15 min, 30 min, ...135 min). TRIS : témoin négatif (sans traitement) ; CBCDA : carboplatine (5 mg/ml) ; VIT C : vitamine C (0,1 mg/ml) ; VIT E : vitamine E (0,25 mg/ml) ; VIT E + C : la combinaison de la vitamine E et C.

II.3. Effet protecteur des antioxydants à l'égard des dommages induits par le TXL sur les spermatozoïdes

Les résultats relatés dans la figure 15, montrent qu'aucune différence significative n'a été observée entre le TXL et les conditions de protection exprimés par la vitamine C, la vitamine E et aussi en combinant les deux vitamines (VCL entre $32,95 \pm 0,59$ et $56,21 \pm 0,53$ $\mu\text{m/s}$; VSL entre $14,37 \pm 0,24$ et $5,67 \pm 0,27$ $\mu\text{m/s}$; VAP entre $27,87 \pm 0,31$ et $11,07 \pm 0,38$ $\mu\text{m/s}$) avant 60 min , et (VCL entre $17,16 \pm 0,76$ et $20,01 \pm 1,64$ $\mu\text{m/s}$; VSL entre $6,32 \pm 0,61$ et $3,48 \pm 0,47$ $\mu\text{m/s}$; VAP entre $12,77 \pm 0,5$ et $7,77 \pm 0,82$ $\mu\text{m/s}$) après 60 min.

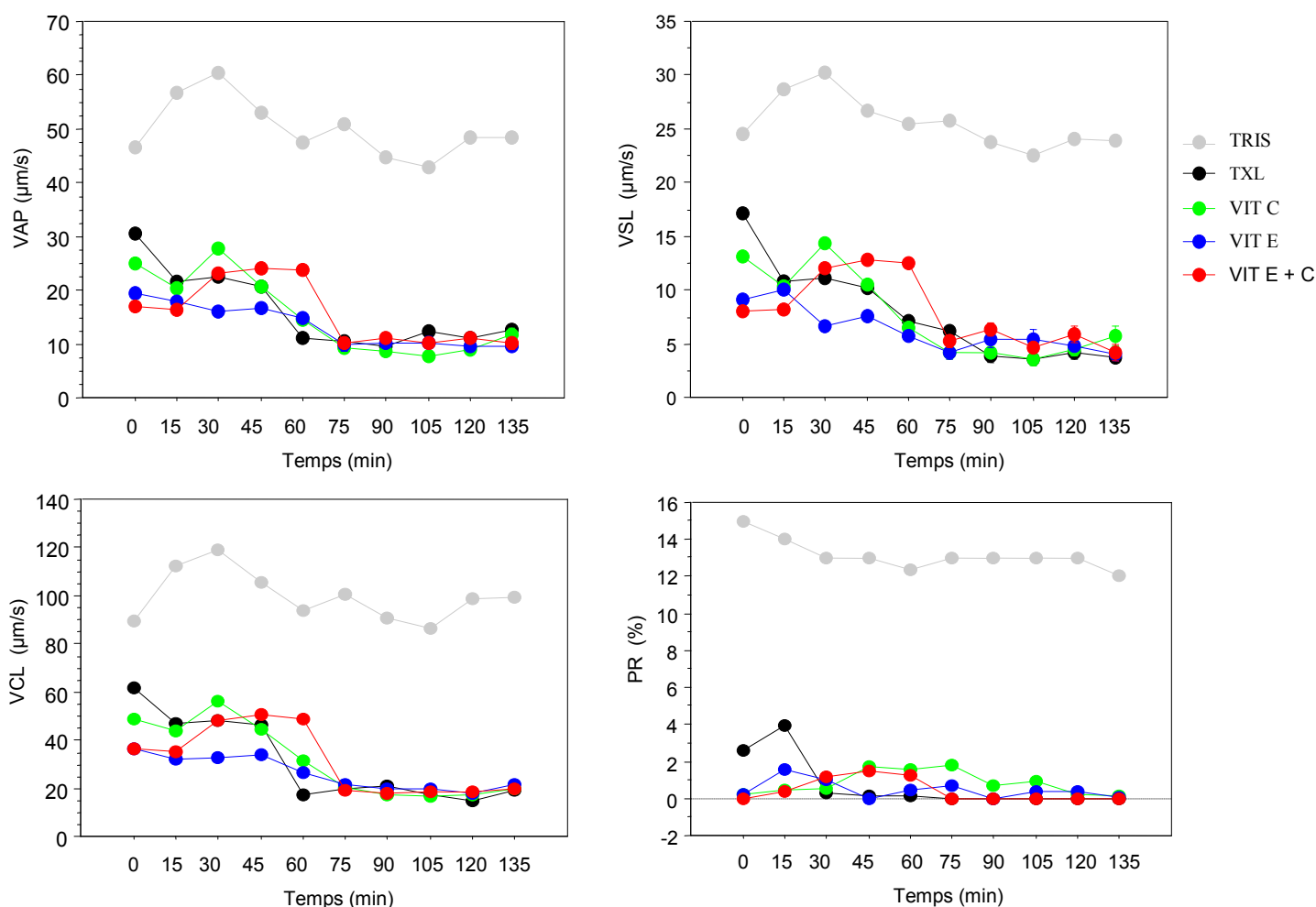


Figure 15 : Les paramètres de mobilité des spermatozoïdes (VAP, VSL, VCL et le % des PR) après incubation avec le TXL prétraités par les antioxydants (0 min, 15 min, 30 min, ...135 min). TRIS : témoin négatif (sans traitement) ; TXL : paclitaxel (0,6 mg/ml) ; VIT C : vitamine C (0,1 mg/ml) ; VIT E : vitamine E (0,25 mg/ml) ; VIT E + C : la combinaison de la vitamine E et C.

III. Discussion

L'espérance de vie des patients atteints du cancer a augmenté de manière considérable grâce au développement en termes d'efficacité des traitements anticancéreux. Ces traitements consistent à la prescription de différents types d'anticancéreux à savoir, le carboplatine (CBCDA) et le paclitaxel (TXL) qui sont utilisés dans les protocoles thérapeutiques seuls ou combinés pour traiter plusieurs cancers, dont le cancer des testicules (**Pectasides *et al.* 2009; Ghobadi *et al.* 2017; Rabaça *et al.* 2020**). Néanmoins, plusieurs effets secondaires peuvent apparaître au cours et après ces traitements comme par exemple la diminution de la qualité du sperme des patients (**Agarwal *et al.* 2008**).

Les études décrites dans la littérature indiquent que les agents de chimiothérapie induisent une stérilité, qui s'explique par un effet du médicament sur les cellules souches au cours de la spermatogénèse (dommage au niveau de l'ADN et des modifications de la chromatine) ou par un effet sur les testicules (**Bujan and De Mas 2002**). En effet, des études ont démontré que le CBCDA et le cisplatine (CDDP) augmentent les aberrations chromosomiques dans les spermatozoïdes des souris prépubères (**Allen *et al.* 2020**), et l'étoposide (VP16) engendre la fragmentation de l'ADN dans les cellules testiculaires du rat (**Okada *et al.* 2009**). Aussi, il a été démontré qu'après l'administration de la chimiothérapie gonadotoxique, le patient peut développer une oligozoospermie, voire une azoospermie (**Young 2016**).

Il existe cependant peu de recherches portant sur l'effet cytotoxique direct sur les spermatozoïdes matures, dont les mécanismes moléculaires impliqués restent inconnus et mal élucidés (**Hong *et al.* 1985; Rabaça *et al.* 2020**).

Par conséquent, le présent travail est consacré pour tenter de fournir des informations sur les effets directs des anticancéreux sur les spermatozoïdes matures d'une part et d'autre part pour évaluer les effets potentiels protecteurs induits par les antioxydants.

Notre choix de la cellule spermatique s'explique par le fait que cette cellule est révélatrice de son état physiologique. A cet effet, la mesure des paramètres de motilité (VAP, VSL, VCL et les % des progressifs rapides) a été réalisée en premier lieu en exposant les spermatozoïdes aux anticancéreux (CBCDA et TXL), et dans un second temps après pré-incubation avec les antioxydants (la vitamine C, la vitamine E et/ou la combinaison de ces deux vitamines).

Nos résultats d'induction révèlent un effet délétère sur la motilité des spermatozoïdes qui dépend de l'anticancéreux à savoir le CBCDA et le TXL, dont ce dernier a altéré significativement la mobilité des spermatozoïdes en comparaison au CBCDA. Cela, n'a jamais été auparavant démontré dans la littérature.

Cependant, il est important de signaler que le stress oxydant (OS) peut être également l'un des facteurs nocifs engendré par les anticancéreux sur les voies génitales masculines (**Ghobadi et al. 2017; Semet et al. 2017; Agarwal et al. 2018; Nna et al. 2020**). Pour cela, des travaux ont été menés sur la supplémentation en antioxydants pour prévenir les dommages oxydatifs et aussi pour traiter la stérilité masculine (**Takeshima et al. 2019**).

Parmi ces antioxydants, la vitamine E appelée aussi α -tocophérol, est indiquée comme étant le premier inhibiteur de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (**Massaeli et al. 1999**). Cependant, l' α -tocophérol est une vitamine liposoluble, instable et peu soluble dans les milieux aqueux. Une stratégie pour l'amélioration de sa stabilité et de sa solubilité consiste en son encapsulation dans des cyclodextrines (**Sueishi et al. 2012**). Ce complexe n'est pas encore étudié dans la protection des spermatozoïdes contre l'effet direct délétère des anticancéreux.

Il est rapporté que l'utilisation de la vitamine E sous sa forme libre génère une entité radicalaire (α -tocophéryl). Cet effet peroxydant de la vitamine E peut être contrecarré par la présence de la vitamine C qui joue un rôle réducteur de l' α -tocophéryl (**Chan 1993**). Ceci est en concordance avec les résultats obtenus par la combinaison des vitamines E et C, utilisées en concomitance avec le CBCDA sur les spermatozoïdes. En constate que ces résultats sont nettement meilleurs en comparaison avec l'utilisation de ces deux vitamines séparées. Cela s'explique par un effet synergique de ces deux antioxydants dans la préservation et la protection des spermatozoïdes contre les dommages oxydatifs engendrés par le traitement anticancéreux. Cet effet synergique a été déjà démontré dans des études de cryoconservation des spermés, dont la combinaison de ces deux vitamines exercent un meilleur effet protecteur (**Krishnamoorthy et al. 2007; Zhao et al. 2015**).

Cependant, nos résultats expriment qu'aucun effet protecteur des antioxydants n'apparaît lors de l'exposition des spermatozoïdes au TXL. Cela, s'explique par le fait que le TXL engendre des effets délétères plus significatifs sur les spermatozoïdes dont la concentration des antioxydants utilisée n'a pas protégé les cellules spermatiques.

Les résultats de notre travail démontrent pour la première fois que la CBCDA et le TXL affectent distinctement la mobilité des spermatozoïdes matures *in vitro*. Cela, pourrait s'expliquer par un mécanisme d'action différent. Par ailleurs, la combinaison de la vitamine E et C peuvent être un élément potentiel de protection dans la thérapie adjuvante.

Conclusion

Conclusion

Dans cette étude, nous nous sommes fixé comme objectifs d'étudier l'impact direct des anticancéreux sur les spermatozoïdes matures d'une part, et d'autre part d'évaluer l'effet protecteur de certains antioxydants à l'égard des dommages engendrés par ces derniers.

Notre approche expérimentale consiste à évaluer les paramètres de motilité spermatique suite à une exposition aux certains agents de chimiothérapie tels que le carboplatine (CBCDA) et le paclitaxel (TXL). Nous avons ensuite procédé à étudier l'effet protecteur de la vitamine C et E, seules et en association, dans le but de préserver ces paramètres spermatiques.

Au terme de notre travail, nous pouvons conclure que les molécules de chimiothérapie agissent différemment sur les spermatozoïdes matures. Les résultats d'induction révèlent un effet délétère sur la motilité des spermatozoïdes qui dépend de l'anticancéreux à savoir le CBCDA et le TXL, dont ce dernier a altéré significativement la mobilité des spermatozoïdes en comparaison au CBCDA. Le prétraitement avec les différentes molécules antioxydantes diffère également d'un antioxydant à un autre et dépend aussi de l'agent anticancéreux. L'association de la vitamine E et C a démontré un meilleur effet protecteur contre le CBCDA ; ce qui suggère que cette combinaison peut être nécessaire comme agent adjuvant pour préserver la fertilité masculine pendant et après les traitements par la chimiothérapie.

La découverte de nouvelles propriétés de molécules antioxydantes à savoir l'effet protecteur à l'égard des dommages oxydatifs des molécules anticancéreuses, présente un intérêt majeur pour la mise au point de nouvelles thérapies conduisant au contrôle de l'infertilité masculine. Des études ultérieures pourraient être envisagées pour rechercher d'autres combinaisons en antioxydants avec des concentrations optimales afin d'assurer une meilleure protection de la qualité du sperme humain durant les cures de chimiothérapie.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

Agarwal, A., Makker, K., and Sharma, R. (2008). "Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update." *American Journal of Reproductive Immunology* 59(1): 2-11.

Agarwal, A., Rana, M., Qiu, E., AlBunni, H., Bui, A. D., and Henkel, R. (2018). "Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility." *Andrologia* 50(11): e13126.

Allen, C. M., Lopes, F., Mitchell, R. T., and Spears, N. (2018). "How does chemotherapy treatment damage the prepubertal testis?" *Reproduction* 156(6): R209-R233.

Allen, C. M., Lopes, F., Mitchell, R. T., and Spears, N. (2020). "Comparative gonadotoxicity of the chemotherapy drugs cisplatin and carboplatin on prepubertal mouse gonads." *Molecular Human Reproduction* 26(3): 129-140.

Barati, E., Nikzad, H., and Karimian, M. (2020). "Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management." *Cellular and Molecular Life Sciences* 77(1): 93-113.

Boumenir, M., Merzouk, Y., and Iguer-Ouada, M. (2018). "Investigation de l'impact des antibiotiques sur les paramètres de mobilité spermatique *in vitro*."

Bujan, L., and De Mas, P. (2002). "Génotoxicité des chimiothérapies et radiothérapies: Quelles sont les conséquences pour le spermatozoïde humain?" *Andrologie* 12(3): 284-294.

Chan, A. C. (1993). "Partners in defense, vitamin E and vitamin C." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 71(9): 725-731.

Chevreau, C., and Huguet, F. (1995). "Chimiothérapie anticancéreuse et fertilité masculine." *Andrologie* 5(4): 458-464.

Gauthier, T., Piver, P., Durand, L. M., Donadel, L., Pech, J. C., Roux, C., and Aubard, Y. (2010). "Chemotherapy and women fertility preservation." *Presse Medicale* 39(7-8): 786-793.

Ghobadi, E., Moloudizargari, M., Asghari, M. H., and Abdollahi, M. (2017). "The mechanisms of cyclophosphamide-induced testicular toxicity and the protective agents." *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 13(5): 525-536.

Groopman, J. E., and Itri, L. M. (1999). "Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment." *Journal of the National Cancer Institute*. 91(19): 1616-1634.

Hamamah, S., Grizard, G., Lanson, M., Sion, B., Barrière, P., and Royère, D. (1996). "Composition lipidique membranaire durant la préparation de spermatozoïdes à la fécondation." *Andrologie* 6(2): 141-149.

Hong, C., Chiang, B., Ku, J., and Wu, P. (1985). "Screening the in vitro sperm-immobilizing effect of some anticancer drugs." *Human Toxicology* 4(4): 461-464.

Jones, R. (1998). "Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis." *Journal of Reproduction and Fertility*. 53: 73-84.

Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., Arunkumar, A., Vignesh, R., Aruldas, M., and Arunakaran, J. (2007). "Ameliorative effect of vitamins (α -tocopherol and ascorbic acid) on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in rat epididymal sperm." *Reproductive Toxicology* 23(2): 239-245.

Lemkecher, T., Dartigues, S., Vaysse, J., Kulski, O., Barraud-Lange, V., Gattegno, L., and Wolf, J. P. (2005). "Leucocytospermia, oxidative stress and male fertility: facts and hypotheses." *Gynecologie, Obstetrique and Fertilité* 33(1-2): 2-10.

Li, Y. F., Fu, S., Hu, W., Liu, J. H., Finkel, K. W., Gershenson, D. M., and Kavanagh, J. J. (2007). "Systemic anticancer therapy in gynecological cancer patients with renal dysfunction." *International Journal of Gynecologic Cancer* . 17(4): 739-763.

Mameri, A., Bournine, L., Mouni, L., Bensalem, S., and Iguer-Ouada, M. (2021). "Oxidative stress as an underlying mechanism of anticancer drugs cytotoxicity on human red blood cells' membrane." *Toxicology in Vitro* 72: 105106.

Massaeli, H., Sobrattee, S., and Pierce, G. N. (1999). "The importance of lipid solubility in antioxidants and free radical generating systems for determining lipoprotein peroxidation." *Free Radical Biology and Medicine* 26(11-12): 1524-1530.

Mones, J. V., and Soff, G. (2019). "Management of Thrombocytopenia in Cancer Patients." *Thrombosis and Hemostasis in Cancer* 179: 139-150.

Moreau, J., Reignier, A., Leandri, R., Parinaud, J., Fréour, T., and Gatimel, N. (2018). "Spermogramme et spermocytogramme manuels et automatisés-Test de migration-survie." *Revue Francophone des Laboratoires* 2018(504): 28-35.

Nna, V. U., Ujah, G. A., Suleiman, J. B., Mohamed, M., Nwokocha, C., Akpan, T. J., Ekuma, H. C., Fubara, V. V., Kekung-Asu, C. B., and Osim, E. E. (2020). "Tert-butylhydroquinone preserve testicular steroidogenesis and spermatogenesis in cisplatin-intoxicated rats by targeting oxidative stress, inflammation and apoptosis." *Toxicology* 441: 152528.

Okada, F. K., Stumpp, T., & Miraglia, S. M. (2009). "Carnitine reduces testicular damage in rats treated with etoposide in the prepubertal phase." *Cell and Tissue Research* 337(2): 269-280.

Pectasides, D., Pectasides, E., Papaxoinis, G., Skondra, M., Gerostathou, M., Karageorgopoulou, S., Kamposioras, C., Tountas, N., Koumarianou, A., and Psyrris, A. (2009). "Testicular function in poor-risk nonseminomatous germ cell tumors treated with methotrexate, paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin combination chemotherapy." *Journal of Andrology* 30(3): 280-286.

Perrard, M. H., Grenet, C., Prisant, N., Geoffroy-Siraudin, C., Segretain, D., Guichaoua, M. R., Pointis, G., and Durand, P. (2010). "European regulation REACH and the assessment of testicular toxicity." *Medecine Sciences (Paris)* 26(3): 305-310.

Poirot, C., Sitbon, L., Fortin, A., Berthaut, I., Jaudi, S., Anastacio, A., and Prades, M. (2013). "Fertility and cancer." *Presse Médicale* 42(11): 1513-1520.

Pons-Rejraji, H., Sion, B., Saez, F., Brugnon, F., Janny, L., and Grizard, G. (2009). "Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility." *Gynecologie, Obstetrique and Fertilité* 37(6): 529-535.

Rabaça, A., Ferreira, C., Bernardino, R., Alves, M., Oliveira, P., Viana, P., Barros, A., Sousa, M., and Sá, R. (2020). "Use of antioxidant could ameliorate the negative impact of etoposide on human sperm DNA during chemotherapy." *Reproductive Biomedicine Online* 40(6): 856-866.

Rives, N., Milazzo, J. P., Arkoun, B., Travers, A., Perdrix, A., Bironneau, A., and Mace, B. (2012). "Male gamete...spermatozoon or spermatid?." *Gynecologie, Obstetrique and Fertilité* 40(11): 671-674.

- Robaire, Bernard, and Barry T. Hinton. (2006). "The Epididymis ". *Physiology of Reproduction*: 1071–1148
- Robert, J. (2007). "Les poisons du fuseau." *Oncologie* 9(11): 766-772.
- Rollet, J. (1999). "Biochimie du liquide séminal: Intérêt pour le clinicien." *Andrologie* 9(4): 468-471.
- Schlosser, J., Nakib, I., Carre-Pigeon, F., and Staerman, F. (2006). "Assessment of male infertility." *Journal of Urology (Paris)* 40(6): 349-354.
- Semet, M., Paci, M., Saïas-Magnan, J., Metzler-Guillemain, C., Boissier, R., Lejeune, H., and Perrin, J. (2017). "The impact of drugs on male fertility: a review." *Andrology* 5(4): 640-663.
- Sharma, R. K., and Agarwal, A. (1996). "Role of reactive oxygen species in male infertility." *Urology* 48(6): 835-850.
- Shati, A. A. (2019). "Resveratrol improves sperm parameter and testicular apoptosis in cisplatin-treated rats: effects on ERK1/2, JNK, and Akt pathways." *Systems Biology in Reproductive Medicine* 65(3): 236-249.
- Stortecky, S., and Suter, T. M. (2010). "Insights into cardiovascular side-effects of modern anticancer therapeutics." *Current Opinion in Oncology* 22(4): 312-317.
- Sueishi, Y., Hori, M., and Inazumi, N. (2012). "Characterization of inclusion complex of vitamin E compound with 2, 6-di-O-methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer and its kinetic determination for radical scavenging ability." *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 72(3-4): 467-472.
- Takeshima, T., Kuroda, S., and Yumura, Y. (2019). "Cancer Chemotherapy and Chemiluminescence Detection of Reactive Oxygen Species in Human Semen." *Antioxidants (Basel)* 8(10).
- Taouzinet, L., Fatmi, S., Khellouf, A., Skiba, M., and Iguer-Ouada, M. (2020). "Alpha tocopherol loaded in liposome: Preparation, optimization, characterization and sperm motility protection." *Drug Delivery Letters* 10(3), 228-236.
- Vakalopoulos, I., Dimou, P., Anagnostou, I., and Zeginiadou, T. (2015). "Impact of cancer and cancer treatment on male fertility." *Hormones (Athens)*. 14(4): 579-589.

Yamaguchi, K., and Fujisawa, M. (2011). "Anticancer chemotherapeutic agents and testicular dysfunction." *Reproductive Medicine and Biology* 10(2): 81-87.

Young, J. (2016). "Infertilité masculine: mécanismes, causes et exploration." *Medecine Clinical Endocrinology Diabetes* 80: 29-36.

Zhao, X., Li, Y., Cao, S., Hu, J., Wang, W., Hao, R., Gui, L., and Zan, L. (2015). "Protective effects of ascorbic acid and vitamin E on antioxidant enzyme activity of freeze-thawed semen of Qinchuan bulls." *Genetics and Molecular Research* 14(1): 2572-2581.

Résumé

L'amélioration de l'espérance de vie de patients atteints de cancers a attiré une attention particulière des chercheurs en raison des risques de complications à long terme par les traitements. La stérilité est parmi les complications les plus fréquentes chez les patients cancéreux dont, la plupart des agents anticancéreux sont gonadotoxiques. En effet, ces agents induisent une stérilité masculine qui s'explique généralement par un effet sur les cellules souches au cours de la spermatogénèse (dommage au niveau de l'ADN et des modifications de la chromatine) ou bien un effet sur les testicules. Cependant, l'effet cytotoxique direct sur les spermatozoïdes matures, dont les mécanismes moléculaires impliqués restent inconnus et mal élucidés. Les travaux menés au cours de cette recherche consistent d'une part, à étudier l'impact direct de quelques anticancéreux sur les spermatozoïdes matures à savoir le carboplatine (CBCDA) et le paclitaxel (TXL) et d'autre part à évaluer l'effet protecteur des antioxydants (la vitamine C et la vitamine E, seule ou en association) à l'égard des dommages induits par ces derniers. Pour cela, deux approches expérimentales ont été élaborées en mesurant les paramètres de motilité spermatique assistée par ordinateur (CASA). La première a été réalisée après l'exposition directe des spermatozoïdes de bélier aux agents anticancéreux et la deuxième approche a été menée en traitant les cellules spermatiques avec les anticancéreux, préalablement co-incubées avec les antioxydants. Les résultats obtenus ont démontré que le TXL induit une toxicité très significative sur la motilité spermatique ($VSL=4,64\pm 0,67 \mu\text{m/s}$) par rapport au CBCDA ($VSL=9,43\pm 0,23 \mu\text{m/s}$), principalement après 45 min de co-incubation. La combinaison de la vitamine E et C exercent un effet cytoprotecteur potentiel contre le CBCDA (VSL entre $14,04\pm 0,21$ et $16,47\pm 0,3 \mu\text{m/s}$), ce qui se caractérise par un effet synergique. Par contre, aucun effet protecteur n'a été enregistré à l'égard du TXL. En perspectives, il serait intéressant de réaliser d'autres tests en utilisant une large gamme d'agents anticancéreux, dans le but de prévenir et de traiter la stérilité chimio-induite et en même temps minimiser les effets secondaires des anticancéreux.

Mots clés : Infertilité masculine, anticancéreux, cellule spermatique, stress oxydatif, antioxydants.

Abstract

The improvement of longevity of cancer patients attracted attention of researchers because of the risks of treatment complications. Infertility is a common adverse event in cancer patients, which the most of anticancer agents are gonadotoxic. Moreover, these agents induced male sterility, explained generally by their effect on stem cells during spermatogenesis (DNA damages and chromatin modification) or on the testes. However, the direct cytotoxic effect on mature spermatozoa, whose molecular mechanisms involved remain unknown and poorly understood. In this respect, this work consists, on the one hand, to study the direct impact of some anticancer drugs on mature spermatozoa, namely carboplatin (CBCDA) and paclitaxel (TXL) and, on the other hand, to evaluate the protective effect of antioxidants (vitamin C and vitamin E, alone or in combination) against the damage induced by these drugs. Two experimental approaches were developed by measuring the motility parameters using computer-assisted sperm analyser (CASA). The first was performed after direct exposure of ram sperm to anticancer agents and the second approach was carried out by treating sperm cells with anticancer drugs, previously co-incubated with antioxidants. The results demonstrated that TXL affect significantly sperm motility ($VSL=4.64\pm 0.67 \mu\text{m/s}$) compared to CBCDA ($VSL=9.43\pm 0.23 \mu\text{m/s}$), mainly after 45 min of co-incubation. The combination of vitamin E and C exert a potential cytoprotective effect against CBCDA (VSL among 14.04 ± 0.21 and $16.47\pm 0.3 \mu\text{m/s}$), which is characterized by a synergistic effect. Instead, no protective effect was obtained after exposure to TXL. In the future, it would be interesting to perform further experiments using a wide range of anticancer agents, in order to prevent infertility and to reduce side effects of the anticancer drugs.

Keywords: Male infertility, anticancer drugs, sperm cell, oxidative stress, antioxidants.

ملخص

التحسن في متوسط العمر المتوقع لمرضى السرطان تحصل على اهتمام خاص من طرف الباحثين بسبب مخاطر حدوث مضاعفات طويلة الأمد من العلاج الكيميائي. يعتبر العقم من أكثر المضاعفات شيوعاً لدى مرضى السرطان، ومعظم العوامل المضادة للسرطان تؤثر سلباً على الغدد التناسلية. هذا لأن هذه العوامل تحفز عقم الذكور، والذي يفسر عموماً من خلال التأثير على الخلايا الجذعية أثناء تكوين الحيوانات المنوية (تلف الحمض النووي والتغيرات في الكروماتين) أو التأثير على الخصيتين. ومع ذلك، فإن التأثير المباشر للسم للخلايا على الحيوانات المنوية الناضجة، لا تزال آلياتها الجزيئية غير معروفة وغير مفهومة جيداً. يتمثل العمل الذي تم خلال هذا البحث، من ناحية، في دراسة التأثير المباشر لبعض الأدوية المضادة للسرطان على الحيوانات المنوية الناضجة، وهي كاربوبلاتين (CBCDA) وباكلبتاكسيل (TXL)، ومن ناحية أخرى، في تقييم التأثير الوقائي للحيوانات المنوية بمضادات الأكسدة (فيتامين ج وفيتامين هـ، بمفردهما أو معاً) ضد الأضرار التي يسببها هذا الأخير. لهذا، تم تطوير نهجين تجريبيين عن طريق قياس معلمات حركة الحيوانات المنوية بمساعدة الكمبيوتر (CASA) تم إجراء الأول بعد التعرض المباشر للحيوانات المنوية في الكباش لعوامل مضادة للسرطان، بينما تم تنفيذ الطريقة الثانية من خلال علاج خلايا الحيوانات المنوية بأدوية مضادة للسرطان، والتي سبق احتضانها مع مضادات الأكسدة. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن TXL يسبب تأثيراً كبيراً للغاية على حركة الحيوانات المنوية ($VSL=4,64\pm 0,67 \mu\text{m/s}$) مقارنة بـ CBCDA ($VSL=9,43\pm 0,23 \mu\text{m/s}$) بعد مضي 45 دقيقة. يؤدي الجمع بين فيتامين E و C إلى حماية محتملة للخلايا ضد CBCDA ($VSL: 14,04\pm 0,21 - 16,47\pm 0,3 \mu\text{m/s}$)، والذي يتميز بتأثير تآزري. من ناحية أخرى، لم يتم تسجيل أي تأثير وقائي فيما يتعلق بـ TXL في المستقبل، سيكون من المثير الاهتمام بإجراء مزيد من الاختبارات باستخدام مجموعة واسعة من الأدوية المضادة للسرطان، بهدف منع وعلاج العقم الناتج عن العلاج الكيميائي وفي نفس الوقت تقليل الآثار الجانبية للأدوية المضادة للسرطان.

الكلمات المفتاحية: العقم عند الرجال، الأدوية المضادة للسرطان، الخلايا المنوية، الإجهاد التأكسدي، مضادات الأكسدة.